



Approche mécanique de l'adhésion cellulaire, ouverture au diagnostic

Rachel Milloud

► To cite this version:

Rachel Milloud. Approche mécanique de l'adhésion cellulaire, ouverture au diagnostic. Physique [physics]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENY034 . tel-01363672

HAL Id: tel-01363672

<https://theses.hal.science/tel-01363672>

Submitted on 11 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Rachel MILLOUD

Thèse dirigée par **le Dr Lionel BUREAU**
co-dirigée par **le Dr Martial BALLAND**

préparée au sein du **Laboratoire Interdisciplinaire de Physique**
dans **l'École Doctorale de Physique**

Approche mécanique de l'adhésion cellulaire, ouverture au diagnostic

Thèse soutenue publiquement le **26 septembre 2014**,
devant le jury composé de :

Mme Marie-Pierre VALIGNAT

Professeur, Université de Marseille, Rapporteur

Mr Sylvain GABRIELE

Enseignant-Chercheur, Université de Mons, Belgique, Rapporteur

Mme Florence RUGGIERO

Directeur de recherche, CNRS, ENS Lyon, Examineur

Mr François GALLET

Professeur, Université Paris 7 Diderot, Président

Mr Lionel BUREAU

Chargé de recherche, CNRS, Grenoble, Directeur de thèse

Mr Martial BALLAND

Enseignant-chercheur, UJF, Grenoble, Co-directeur de thèse

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*





A mes parents,

Remerciements

Ces trois années de thèse ne sont pas simplement trois années de travail, elles représentent surtout de nombreuses rencontres, des moments intenses, une meilleure compréhension de soi et un aboutissement personnel.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury qui me font l'honneur d'examiner mon travail: Marie-Pierre Valignat, Sylvain Gabriele, François Gallet, et Florence Ruggiero ainsi que Grégory Giannone pour sa présence.

Je tiens à remercier très chaleureusement Martial, pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour avoir été mon guide durant toutes ces années. Merci de m'avoir fait confiance et soutenu durant ces trois années. Gardes le plus longtemps possible ton enthousiasme, ton humanisme et ta sincérité qui sont si précieuses.

Un grand merci également Olivier Destaing pour m'avoir initié à la biologie. Ton ouverture d'esprit, ton optimisme et toutes nos petites conversations entre deux passages de cellules ont toujours été très agréables.

Je tiens à remercier également Corinne Albigès-Rizo pour son soutien et sa présence, mais également Irène, Giovanni, Lionel et Ingrid pour m'avoir aidé dans mes travaux ainsi que les membres de mon équipe pour leur bonne humeur quotidienne et avec qui j'ai passé de très beaux moments : Antoine, Aurélien, Aurélie et Philippe.

A mes collègues thésards et post-docs: Kalpana pour m'avoir formé et initié aux manip, Richard pour m'avoir aidé en matlab. Un grand merci à Ianis avec qui je me suis

bien aérée la tête tous les weekends durant cette dernière année de thèse ainsi qu'à Mariana, Rachel et beaucoup plus récemment Elisa avec qui j'ai eu la joie de partager mon bureau pendant les quatre derniers mois et dont la compagnie fut été fort agréable.

Un petit paragraphe pour remercier tous les étudiants en master qui sont passés par là pendant quelques mois et qui ont apporté leur fraîcheur et entre autre: Laurent, Dorian et Joseph, Katharina, Laura et Juan avec qui j'ai passé des moments très agréables autour d'une bière, sur un vélo ou au soleil.

Une thèse, c'est également des collaborations et une de ces collaborations m'a permis de rencontrer Elisabeth, que j'ai connu l'hors d'une conférence à Obergurgl avec qui par la suite nous avons pu collaborer et avec qui tout de suite j'ai bien déliré!

Adèle avec qui j'ai pu tester l'optogénétique, partager des bière et de la bonne humeur!

J'en arrive aux remerciements plus personnels.

Tout d'abord et à mes meilleurs amis: Pierre, Martial, Joss, Nat et Caterina pour exister dans ma vie, avec qui j'ai partagé énormément et vécu tellement d'aventures. Je vous souhaite tout ce qu'il y a de mieux, vous êtes vraiment exceptionnel! Kelly pour nos nombreux délires et ta présence qui m'a beaucoup aidé dans mes passages difficiles.

Et enfin je tiens surtout à remercier mes parents pour tout ce qu'ils m'ont donné et permis de réaliser dans ma vie, pour leur ouverture d'esprit, leur compréhension des humains et leur soutien sans égal.

Résumé

La capacité des cellules à sentir les propriétés physiques de leur environnement est un facteur déterminant de l'homéostasie tissulaire. Ainsi, la rigidité de la matrice extracellulaire (forces exogènes) et les tensions du cytosquelette (forces endogènes) coopèrent de manière fonctionnelle modulant les transformations phénotypiques. Les cellules perçoivent et transmettent des forces en développant des structures d'adhérences appelées adhésions focales. Ces adhésions sont composées de protéines transmembranaires, les intégrines, qui font le lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

La partie centrale de mon projet de thèse aborde la question du couplage des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la mécanotransduction. Les données actuelles plaident fortement en faveur d'une relation bidirectionnelle entre l'adhésion intégrine-dépendante et les forces mécaniques générées dans ce processus. Les approches génétiques classiques ont souligné le rôle majeur des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans mécanosensibilité cellulaire, sans préciser leur contribution relative. Par exemple, la manière dont la modulation de l'expression de l'intégrine $\beta 3$ affecte la génération des forces de traction cellulaires et la distribution des adhésions intégrines-dépendantes reste à être explorées. Dans ce travail de thèse nous avons montré que les intégrines $\beta 1$ ont un rôle essentiel dans la génération de forces cellulaires, que les intégrines $\beta 1$ sont régulées négativement par les intégrines $\beta 3$ en affectant la distribution spatiale des intégrines $\beta 1$ à travers leur capacité à lier à la fois la taline et la kindline. Et enfin, nous avons montré que les intégrines $\beta 3$ régulent temporellement l'activité contractile de la cellule.

J'ai également participé à deux autres études dans le cadre de collaborations avec le Pr. Holmgren et le Dr. Debili, au cours desquelles j'ai utilisé la microscopie à traction de forces comme un outil diagnostique afin d'observer l'effet des forces contractiles dans la formation de la lumière aortique et de la formation des plaquettes sanguines. J'ai ainsi pu confirmer que la protéine α 5 β 1, reliant les fibres contractiles aux VE-cadhérines, est impliquée dans la force intercellulaire nécessaire à la formation de la lumière aortique. Lors d'une deuxième collaboration, j'ai pu montrer que la contractilité des mégacaryocytes, via leur système actomyosine, est nécessaire pour la formation des proplaquettes.

Abstract

Cell ability to sense mechanical properties of their microenvironment is crucial for tissue homeostasis which means their capacity to maintain mechanical integrity as they are submitted to external forces.

Integrins have been highlighted as mechanotransducers able to form micro-scale structures called focal adhesion sites which mechanically link cells to the extracellular matrix by recruiting various adaptors. Both $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins have been identified as the principal actors of tensional homeostasis. However as the resulting mechanotransduction processes are intrinsically dynamic, the respective and cooperative roles $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins need to be addressed over time and space.

In the present work, coupling time-resolved traction force microscopy and genetics approaches, we investigated the respective role of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in active force generation at the single cell level. Our findings show that $\beta 1$ integrins has an essential role in generation of cellular traction forces, $\beta 1$ integrin-generated force is negatively regulated by $\beta 3$ integrins which impacts the redistribution of $\beta 1$ integrin containing adhesion through its ability to bind to talin and kindlin, $\beta 3$ integrin supports min-scale temporal regulation of cellular contractile activity generated by $\beta 1$ integrin. Finally, cell mechanical equilibrium relies on the ability of cells to maintain a fixed contractile moment.

I also participated in two others studies in the framework of collaborations in which I used the traction force microscopy as a diagnostic tool to observe the effect of contractile forces in the formation of the aortic lumière and the formation of proplatelets. I was able to confirm that the protein amotL2 connecting the contractile fibers to VE-cadherin, is involved in intercellular forces necessary for the formation of the aortic lumière. And in a

second collaboration, where I found by using traction force microscopy that the contractility of megakaryocytes via its actomyosin system, is necessary for the formation proplatelets.

Chapitre I. Bases mécaniques et moléculaires de

l'adhésion cellulaire.....7

1. Le cytosquelette	11
1.1. Les microtubules	11
1.2 Les filaments intermédiaires	12
1.3 Le réseau d'actine	13
2. Adhésion cellulaire et interactions avec son environnement.....	17
2.1 La matrice extracellulaire	18
2.2 Les adhésions focales	19
2.3 Les intégrines et leurs régulations	22
2.3.1 Les intégrines: des mécanorécepteurs	22
2.3.2 La taline et la kindline: des activateurs d'intégrines.....	23
2.4 Interaction cellule-cellule: les cadhérines	27
3. Mécanique cellulaire: génération de forces et mécanotransduction	29
4. Objectifs	32

Chapitre II. Outils et techniques expérimentales.....35

1. La microscopie à traction de forces: aspects théoriques	39
2. Micro-fabrication: le gel en polyacrylamide	42
3. Les techniques de biologie cellulaire.....	44

3.1 Culture cellulaire et infections	44
3.2 Immunofluorescence	49
4. Outils d'imagerie et acquisition d'images	50
4.1 Outils d'imagerie	50
4.2 Acquisition d'images	51
5. Le traitement d'images	52
5.1 La microscopie à Traction de Force: aspects expérimentaux	52
5.1.1 Détermination des déplacements	52
5.1.2 Détermination du champ de traction	53
5.1.2.1 Contraction/dilatation: le moment contractile	58
5.1.2.2 L'énergie contractile	59
5.2 Les structures biologiques: analyse quantitative des immunomarquages.....	60
5.2.1. Analyse de l'intensité de fluorescences et de l'aire des adhésions focales	61
5.2.2 Quantification de la distribution spatiale des adhésions	61
5.2.3 Analyse quantitative du ratio de colocalisation des adhésions focales...	63

Chapitre III. L'intégrine $\beta 3$, un régulateur spatio-temporel de la génération des forces de traction via son interaction avec l'intégrine $\beta 1$

Introduction.....	67
Résultats	71

1. L'intégrine $\beta 1$ est un effecteur essentiel des forces de traction cellulaires.....	72
1.1 L'intégrine $\beta 1$ est principalement responsable de la génération de forces cellulaires	73
1.2 Effet de la perte des intégrines $\beta 1$ sur le moment contractile.....	76
2. L'intégrine $\beta 3$ régule négativement les forces de traction cellulaires	78
2.1 La perte de l'intégrine $\beta 3$ induit une augmentation des forces de traction	79
2.2 La perte de l'intégrine $\beta 3$ n'affecte pas le moment contractile.....	80
2.3 Effet de l'intégrine $\beta 3$ sur la morphologie cellulaire	81
3. L'intégrine $\beta 3$ régule la distribution spatiale et l'état d'activation de l'intégrine $\beta 1$	83
3.1 L'intégrine $\beta 3$ régule négativement l'activation des intégrines $\beta 1$	83
3.2 La perte de l'intégrine $\beta 3$ induit une redistribution des intégrines $\beta 1$	85
4. La phosphorylation du second site NPxY est impliquée dans la régulation de l'énergie contractile par l'intégrine $\beta 3$	88
4.1 Description des différentes mutations de l'intégrine $\beta 3$	88
4.2 La kindline est impliquée dans la régulation de l'énergie contractile via son interaction avec l'intégrine $\beta 3$	89
4.3 Analyse du moment contractile et de l'aire d'étalement des cellules	91
4.4 La taline et la kindline sont recrutées en amont de l'intégrines $\beta 3$	92
5. L'intégrine $\beta 3$: un régulateur temporel de l'activité contractile cellulaire	95
Conclusion et perspectives	98

1. Conclusion	99
2. Ouverture: l'optogénétique, une approche dynamique de la modulation de l'intégrine $\beta 1$ par $\beta 3$ dans la génération de forces	101
Chapitre IV. AmotL2 lie les VE cadhérines aux fibres d'actines contractiles nécessaires à l'extension de la lumière aortique	106
1. Contexte	107
2. Résultats.....	110
Article 1	116
CHAPITRE V. La formation de pro-plaquettes anormales dans le syndrome MYH9 résulte de l'augmentation de la contractilité de l'actomyosine et est rétablit par l'inhibition de la myosine IIA.	117
1. Contexte	118
2. Résultats	121
Article 2	125
Chapitre VI. Conclusion générale.....	126
Abréviations	130
Annexes	132

A. PROTOCOLES DE PREPARATION D'HYDROGEL DE POLYACRYLAMIDE ..	133
B. CULTURE CELLULAIRE	136
C. IMMUNOMARQUAGES	138
Bibliographie	140

Chapitre I. Bases mécaniques et moléculaires de l'adhésion cellulaire

La capacité des cellules à adhérer à leurs voisines est un processus clé du développement tissulaire. Les cellules doivent faire bien plus que se «coller» les unes aux autres, il faut qu'elles soient capables de se réorganiser lors du développement de l'organisme (embryogenèse, morphogenèse) et également de résister aux contraintes physiologiques (ou non physiologiques) telles que la contraction musculaire ou la respiration par exemple. De ce fait les cellules doivent moduler leurs adhésions de manière dynamique et ceci en fonction des contraintes biomécaniques qu'elles exercent ou perçoivent. Les cellules doivent donc percevoir les propriétés mécaniques de leur environnement tissulaire et y répondre par des modifications appropriées de leur forme, de leur migration et de leur prolifération afin d'assurer l'homéostasie tissulaire¹.

In vivo, les cellules adhèrent les unes aux autres ou à un substrat appelé la matrice extra-cellulaire (MEC) permettant aux cellules de s'attacher et de guider la migration cellulaire durant le développement embryonnaire et la morphogenèse. En effet la matrice extra-cellulaire fournit non seulement un substrat pour les cellules mais elle est aussi impliquée dans la transmission des signaux environnementaux vers les cellules affectant leur prolifération, leur différenciation et l'apoptose (Thery et al, 2010 ; Engler et al, 2006 ; Paszek et al, 2005 ; Hoffman et al, 2011).

La cellule est alors connectée avec le monde extérieur via des adhésions ce qui lui permet d'exercer des forces fondamentales pour la vie de la cellule (adhésion, migration, division) et également d'adhérer aux cellules voisines afin de créer des tissus. De multiples expériences effectuées à l'interface de la physique et de la biologie ont mis en évidence l'existence d'une régulation mécanique très fine entre les forces intracellulaires (générées par les filaments contractiles du cytosquelette), extra-cellulaires (Bershadsky et al, 2003) et le taux d'expression

¹ L'homéostasie est la capacité que peut avoir un système quelconque à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures.

de protéines adhésives impliquées dans les jonctions cellule/cellule et cellule/substrat (Paszek et al, 2005).

Les forces, exercées ou senties par la cellule, sont ensuite traduites en signaux biochimiques. La capacité des cellules à intégrer l'information de son environnement est appelée mécanotransduction, impliquant l'intégration réciproque des stimuli mécaniques en signaux biochimiques. Cette propriété est fortement basée sur l'activation d'une famille de protéines transmembranaires, les intégrines, fournissant un lien physique entre l'architecture interne de la cellule (tel que le cytosquelette) et son environnement extérieur (Jaalouk et Lammerding, 2009). De plus le processus de mécanotransduction est renforcé par la capacité des protéines transmembranaires, telles que les intégrines et les cadhérines, à générer des signaux intracellulaires en réponse à leur activation mécanique.

Une déstabilisation de cet équilibre biomécanique perturbe la dynamique des adhésions cellulaires induisant une désorganisation tissulaire, créant ainsi, comme dans le cas de certains cancers, un dysfonctionnement de l'organe touché (Figure 1.1).

Récemment, l'exploration de la mécanotransduction s'est faite grâce au développement de nombreuses techniques permettant de mesurer indirectement ou directement les forces générées par les cellules (aspiration par micropipette, micropiliers, etc...). L'une des méthodes principale est la microscopie de traction de forces (TFM) basée sur la mesure du champ de déplacement de billes contenues dans un gel de polyacrylamide élastique transparent et de rigidité contrôlée. Cette technique permet de mesurer l'énergie contractile sur une surface homogène contrairement aux surfaces hétérogènes telles que celles des micropiliers. Complémentaire aux méthodes utilisant des billes magnétiques étalées sur la surface dorsale des cellules (Roca-Cusach, 2009), la TFM permet de mesurer directement les forces cellulaires à l'interface cellule-MEC.

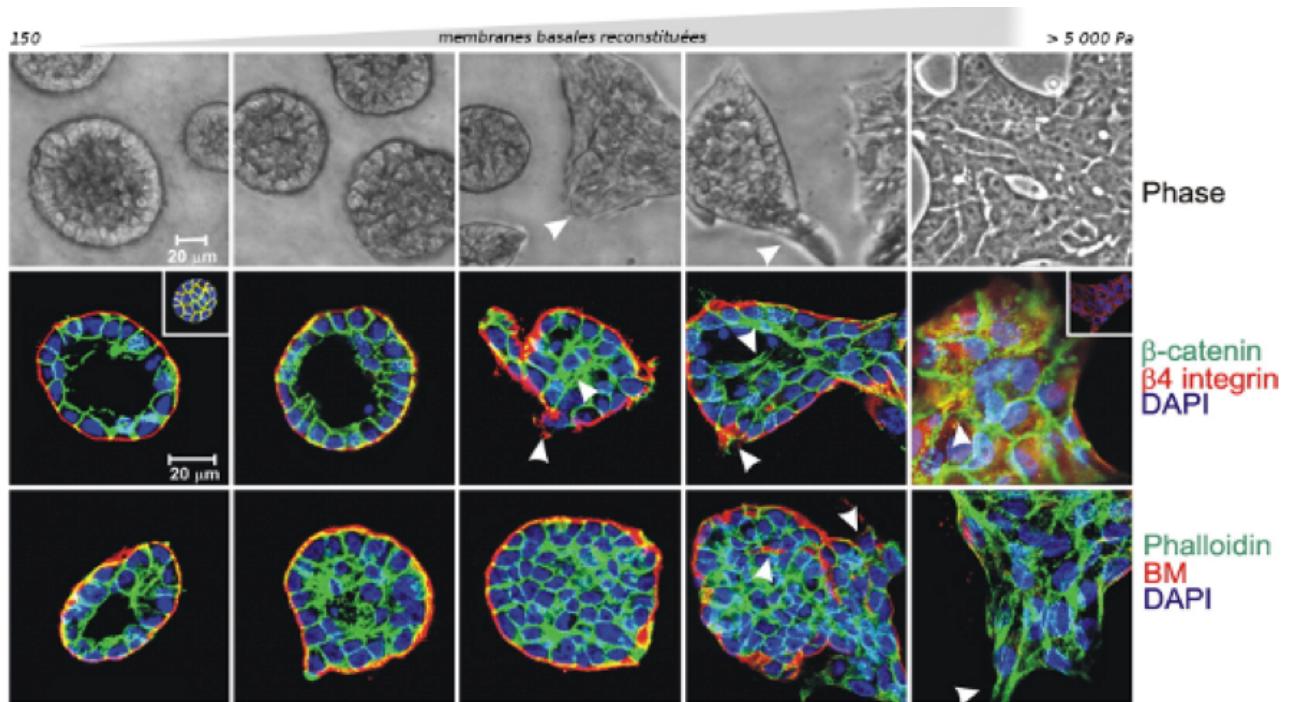


Figure 1.1. L'organisation intercellulaire dépend de l'environnement physique. Formation des acini mammaires d'après Paszek et al. (2005). Le marquage membranaire de la β -caténine révèle les jonctions intercellulaires, l' $\alpha 6 \beta 4$ présente normalement au niveau de la jonction cellule-membrane basale révèle la polarité apico-basale des cellules, la laminine-5 est un composant de la membrane basale (BM) endogène. Les flèches indiquent les ruptures de la membrane basale ou les pertes de polarité cellulaire en réponse à un changement de rigidité.

Ce travail de thèse nous fournit un nouvel éclairage sur les mécanismes fondamentaux du processus de mécanotransduction en liant l'organisation interne des cellules et la génération de forces à l'interface cellule/substrat en utilisant la microscopie à traction de forces. Dans ce premier chapitre nous allons tout d'abord voir les bases moléculaires et mécanique de l'adhésion cellulaire.

1. Le cytosquelette

Le cytosquelette assure de façon générale la forme et l'architecture interne de la cellule. Composant caractéristique de la cellule eucaryote, le cytosquelette est un réseau complexe de filaments et tubules protéiques qui s'étend dans tout le cytoplasme et donne à la cellule sa forme et sa résistance mécanique. Le cytosquelette est une structure très dynamique qui se réorganise continuellement au cours des différents événements cellulaires (migration, division, etc..). Tous les éléments du cytosquelette sont des structures protéiques allongées résultant de la polymérisation d'éléments monomériques. Il regroupe trois réseaux distincts de protéines: les microtubules, les filaments intermédiaires et le réseau d'actine.

1.1. Les microtubules

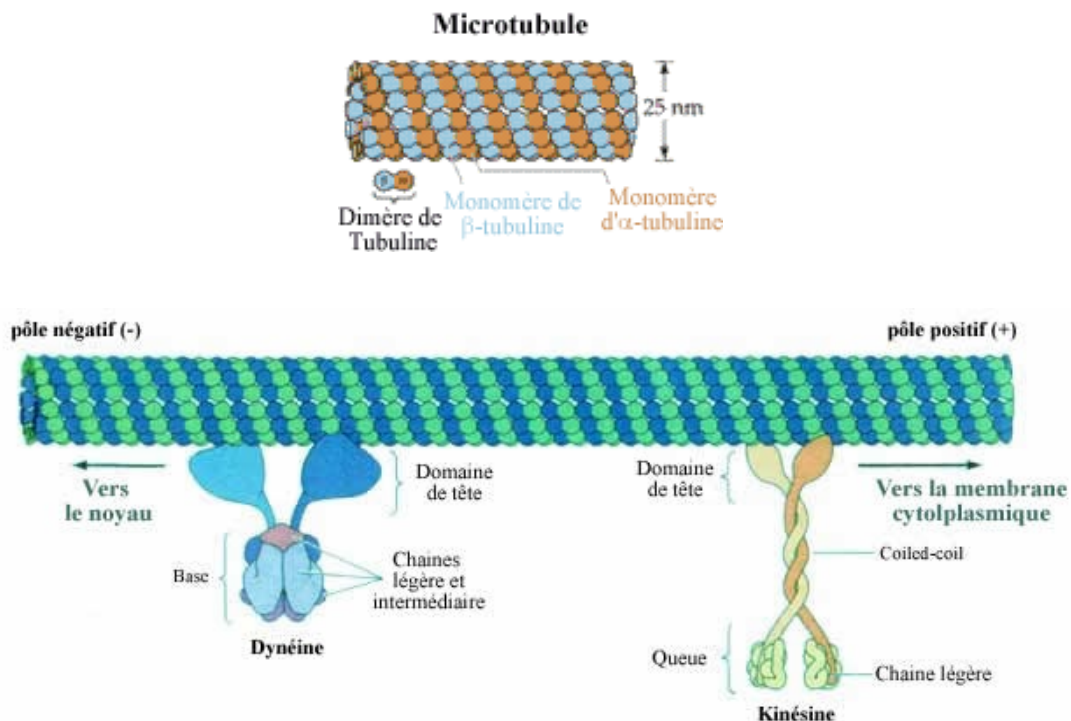


Figure 1.1.1 Les microtubules (<http://virologie.free.fr/documents/virologie/02-cytosquelette/cytosquelette.htm>)

Les microtubules sont les polymères les plus rigides du cytosquelette et sont arrangés en tube cylindrique de 24 nm de diamètre. Leur longueur de persistance vaut environ 2 mm et leur module d'Young environ 1GPa, grandeur déterminées dans les expériences in vitro en observant les fluctuations de courbure de filaments (Venier et al. 1994).

Le réseau de microtubule est une structure dynamique, exerçant des pressions aux extrémités de la cellule et servant de guide aux vésicules entre l'appareil de Golgi et les autres organites. Par une activité ATPasique le déplacement de celles-ci est assuré par des moteurs moléculaires de type kinésine ou dynéine (Maiato et al. 2004; Figure I.1.1).

Les microtubules interviennent notamment dans la division cellulaire. Lors de la mitose les chromosomes se séparent en migrant le long des microtubules par dépolymérisation de ceux-ci.

1.2 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des fibres très résistantes puisqu'elles peuvent supporter de grands efforts et de grandes contraintes mécaniques sans se rompre, ce qui leur donne un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité mécanique des cellules. Ce sont les structures les plus stables du cytosquelette (Janmey, 1991). Ils sont formés à partir de molécules allongées qui s'enroulent de façon hélicoïdale de 8 à 12 nm de diamètre (Figure I.1.2).

Les principaux filaments intermédiaires dans les cellules fibroblastiques sont les lamines nucléaires et la vimentine (Coulombe et al, 2001).

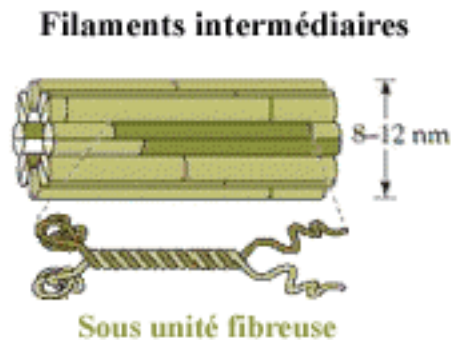


Figure 1.1.2 Les filaments intermédiaires (<http://virologie.free.fr/documents/virologie/02-cytosquelette/cytosquelette.htm>)

Ils interviennent dans l'adhérence et la cohésion mécanique cellulaire car ils sont en relation avec les desmosomes (région où la membrane plasmique d'une cellule adhère à une cellule adjacente) et les hémidesmosomes (jonction existant entre la cellule et la matrice extra-cellulaire) ou encore au niveau de la régulation de la division cellulaire.

La vimentine est recrutée au niveau des adhérences focales ce qui ralentit leur dynamique et augmente les forces d'adhésion. Ce recrutement dépend notamment des intégrines $\beta 3$ et des microtubules (Bhattacharya et al, 2009). Cette connection entre les filaments intermédiaires et les adhérences focales permet de positionner le noyau et est impliquée dans la régulation de la forme cellulaire et de sa polarisation (Burgstaller et al, 2010).

1.3 Le réseau d'actine

L'actine se présente soit sous forme d'un monomère globulaire (actine G) soit sous forme d'un polymère fibrillaire (actine F). La longueur de persistance des

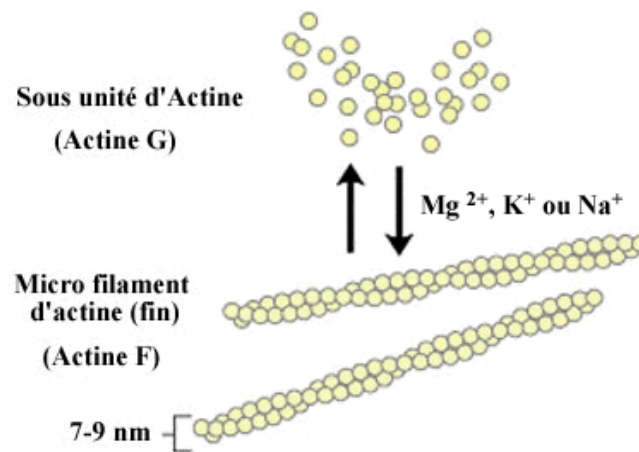


Figure I.1.3.a Les microfilaments (<http://virologie.free.fr/documents/virologie/02-cytosquelette/cytosquelette.htm>)

microfilaments vaut environ $10\ \mu\text{m}$ et leur module d'Young $0,5\text{GPa}$ (Stewart et al, 1993).

L'actine G se polymérise en actine F par une lente hydrolyse de l'ATP en ADP pour donner des filaments en forme de double hélice de 7 à 9 nm (Figure I.1.3.a). Au niveau cellulaire, les filaments d'actines peuvent former des structures intracellulaire très différentes tel qu'un réseau de filaments parallèles dans les filopodes, un gel dans les lamellipodes et le cortex ou un réseau de câbles antiparallèles donnant naissance aux fibres de stress.

L'actine est capable de générer des forces via deux mécanismes. Le premier se présente sous la forme d'un processus de polymérisation/dépolymérisation de l'actine (Mogilner et Oster, 1996) permettant ainsi un mouvement global du filament et leur action combinée à celle des moteurs moléculaires tel que la myosin II sont à l'origine de forces qui sous-tendent différents types de mouvements cellulaires (Shemesh et al, 2012).

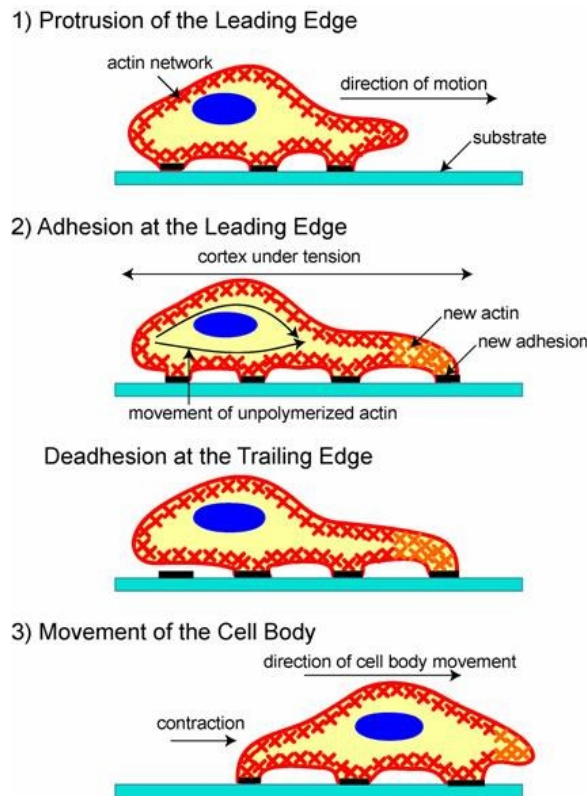


Figure I.1.3.b La polymérisation de l'actine permet l'extension de la membrane à l'avant et confère à la cellule sa mobilité. L'établissement de liaisons avec le substrat permet de fixer l'extension de la membrane à la MEC et de la stabiliser. Mais elles servent également de point d'appui pour les forces contractiles. Ces contacts sont dynamiques et subissent une maturation en complexes d'adhésions plus stables et étendus, appelés points focaux. Ces sites d'adhésions sont reliés plus ou moins fortement en fonction de leur état de maturation au cytosquelette d'actine. (Ananthakrishnan et Ehrlicher, 2007).

Ainsi le réseau d'actine est en grande partie à la base des propriétés dynamiques des cellules dont la génération de forces. La transmission des forces de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule dépend en partie de la contractilité du cytosquelette cellulaire; redistribution, renforcement des liaisons et changement dans la motilité cellulaire (Figure I.1.3.b).

Ces changements impliquent l'activation de l'extension des filaments d'actines, le recrutement de molécules de myosine pour générer les contractions cellulaires, via l'intermédiaire de protéines adhésives liées au cytosquelette d'actine (contractile), comme les intégrines. Les forces intracellulaire développées par le couple actomyosine sont ensuite transmises à la matrice extra-cellulaire permettant ainsi à la cellule d'exercer des forces sur cette dernière et de pouvoir réaliser ainsi des fonctions essentielles telles que l'adhésion, la division ou encore la migration (Figure I.1.3.c).

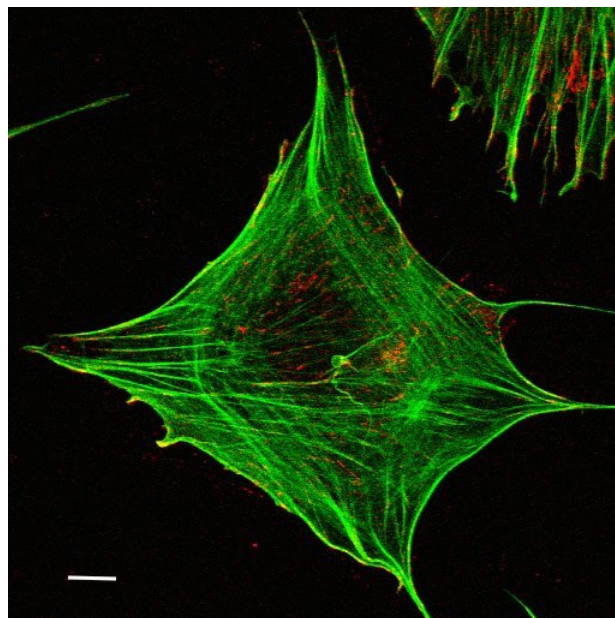


Figure I.1.3.c Cytosquelette d'actine de cellules MEF marqué GFP phalloïdine (vert) et intégrines $\beta 1$ activées 9EG7 (rouge). (Bar d'échelle: 18 μm)

2. Adhésion cellulaire et interactions avec son environnement

L'adhérence cellulaire est impliquée dans des processus cellulaires importants tels que la prolifération et la migration.

L'un des aspects les plus remarquables des tissus est leur capacité à maintenir une intégrité mécanique tandis qu'ils sont soumis à des forces extérieures. Cette intégrité dépend principalement de la régulation de l'adhésion, de la forme et de la contractilité cellulaire. Les cellules sont capables de sentir leur environnement mécanique en développant soit des hémidesmosomes liant les filaments intermédiaires soit des structures d'adhérences appelées adhésions focales afin de sentir et transmettre des forces contractiles sur la matrice extra-cellulaire. Les adhésions focales sont composées de protéines transmembranaires, telles que les intégrines qui font le lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extra-cellulaire en recrutant divers acteurs moléculaires ; ou encore via des jonctions intercellulaires, les desmosomes, composées de protéines transmembranaires appelées cadhérines, faisant le lien entre les cellules.

Ces récepteurs adhésifs agissent comme des mécano-senseurs où les signaux physiques (forces senties ou exercées par la cellule) sont convertis en signaux biochimiques et sont propagés le long des filaments d'actines. Néanmoins, le mécanisme précis à travers lequel les forces mécaniques mènent à une réponse biochimique et moléculaire reste peu connu. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, il est tout d'abord nécessaire de connaître les différents acteurs qui y sont impliqués.

2.1 La matrice extracellulaire

L'espace extra-cellulaire représente une partie importante des tissus ; il est principalement rempli par un enchevêtrement complexe de macromolécules qui constitue la matrice extra-cellulaire. La MEC est composée de différentes protéines structurelles et non structurelles assemblées au sein d'un réseau organisé jouant ainsi un rôle essentiel dans la régulation du comportement des cellules. La MEC fournit ainsi un substrat pour l'adhérence cellulaire, changeant son organisation et sa composition en type de protéines selon le type de cellule présent. En effet la MEC est constituée d'un certain nombre de protéines (fibronectine, collagène, laminine) chacune ayant de multiples domaines avec des sites de liaisons spécifiques (Alberts et al, 2002).

L'interaction de la cellule avec la matrice extra-cellulaire peut avoir des effets dramatiques sur la morphologie et l'organisation interne des cellules. De nombreuses études ont montré l'influence de la MEC sur les cellules en montrant que la densité des ligands (telle que la quantité de fibronectine ou de ligands RGD) avait un impact sur la formation d'adhésion focale et l'étalement des cellules (Cavalcanti et al, 2007 ; Pompe et al, 2009) ou sur la génération de forces (Han et al, 2012). Ou encore en jouant sur les propriétés biochimiques de la MEC dans des tissus modèles en utilisant la technique du *micropattern*. En effet il a été montré que la géométrie de la MEC affectait la structure et la forme du noyau résultant en une condensation de la chromatine et une diminution de la prolifération (Versaevel et al, 2012). Ou encore que la géométrie de la MEC avait un impact sur les forces de traction en jouant sur la distance entre le centre de la cellule et le périmètre montrant que plus le rapport d'aspect est grand plus les forces de traction sont élevées (Rape et al, 2010). La rigidité du substrat influence également la migration cellulaire selon le mécanisme de durotaxie et induit une augmentation des forces de traction (Saez et al, 2005).

La conversion de signaux physiques, tels que les forces contractiles ou les perturbations mécaniques externes, en des signaux bio-chimiques sont des processus cellulaires fondamentaux qui apparaissent aux contacts cellule-MEC, connu sous le nom de sites adhésifs.

2.2 Les adhésions focales

Au sein de l'environnement tissulaire, les cellules sont constamment soumises à des contraintes mécaniques soit par leur propre contractilité soit par des facteurs environnementaux extérieurs. La réponse à ces perturbations mécaniques inclue des changements structurel locaux notamment dans les sites d'adhésions. Lorsque les cellules adhèrent à un substrat, elles s'ancrent à l'aide de plaques de protéines, appelées contacts focaux, qui font le lien avec le cytosquelette d'actine. Lors de leur formation, un certains nombres de protéines cytoplasmiques vont être recrutées (Zaidel-Bar et al, 2007) et vont participer à la transmission des signaux intracellulaires. Dans les adhésions focales, les protéines sont en constante évolution, s'associant et se dissociant continuellement les unes des autres.

Ces adhésions naissantes (moins d'un μm) vont s'agréger en complexe focaux qui sont des structures à courtes durée de vie (quelques secondes). Puis sous l'influence des GTPases et des protéines transmembranaires telles que les intégrines, celles-ci se développent en adhésions focales plus matures et plus stables (persistent quelques minutes). Les intégrines s'agrègent ensuite avec les protéines cytoplasmiques participant aux adhésions focales. Ces contacts d'adhésion permettent à la cellule d'exercer des forces de traction impliquant le système de contractilité actomyosine (Bershadsky et al, 2003) sur sa matrice extracellulaire (Figure I.2.2.a). Les adhésions focales sont des systèmes

hautement dynamiques, capables d'évoluer selon leur sollicitation, et dont la taille présente une grande variabilité. Des expériences ont mis en évidence la mécanosensibilité de ces structures: en effet la croissance des adhésions focales en réponse à une tension externe répond à un certain nombre de lois: les contacts croissent dans la direction de la force appliquée (Riveline et al, 2001 ; Balaban et al, 2001) et l'aire de chaque contact augmente linéairement avec la force appliquée.

Cependant d'autres mesures ont montré une dépendance plus complexe. Des études ont montré un lien inverse entre la taille et les forces de traction à l'avant des cellules migrantes, mais ne trouve aucune corrélation à l'arrière de celles-ci (Beningo et al, 2002). De plus, il a été montré que les petites adhésions focales (1 μm) exercent des niveaux de stress variable (Tan et al, 2003) et que les adhésions focales super matures exercent un haut niveau de stress (Goffin et al, 2006). Inversement, d'autres études ont montré qu'une forte corrélation entre la taille des adhésions et les forces de traction existe uniquement durant les étapes initiales de la maturation des adhésions via la myosine II (Stricker et al, 2011).

La maturation et l'assemblage des adhésions sont très dépendants de l'environnement extracellulaire, ce qui induit des réarrangements structuraux interne de la cellule. Selon le type de protéine transmembranaire, l'adhésion à la MEC est spécifique d'une des protéines la constituant. En effet l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ se liant principalement à la vitronectine et à la fibronectine, celle-ci va mener à des adhésions focales riches en paxilline et vinculine, tandis que l'intégrine $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ étant spécifique de la fibronectine, permet la formation d'adhésions fibrillaires riches en tensine (Zamir et al, 1999). Les adhésions focales sont des structures plates, allongées de quelques micromètres carrés et sont principalement situées à la périphérie de la cellule (Figure I.2.2.b). Les adhésions fibrillaires, quant à elles apparaissent lorsque les adhésions focales sont stables et servent de point

d'ancrage à la cellule permettant ainsi la translocation des intégrines $\beta 1$ (Zamir et al, 1999).

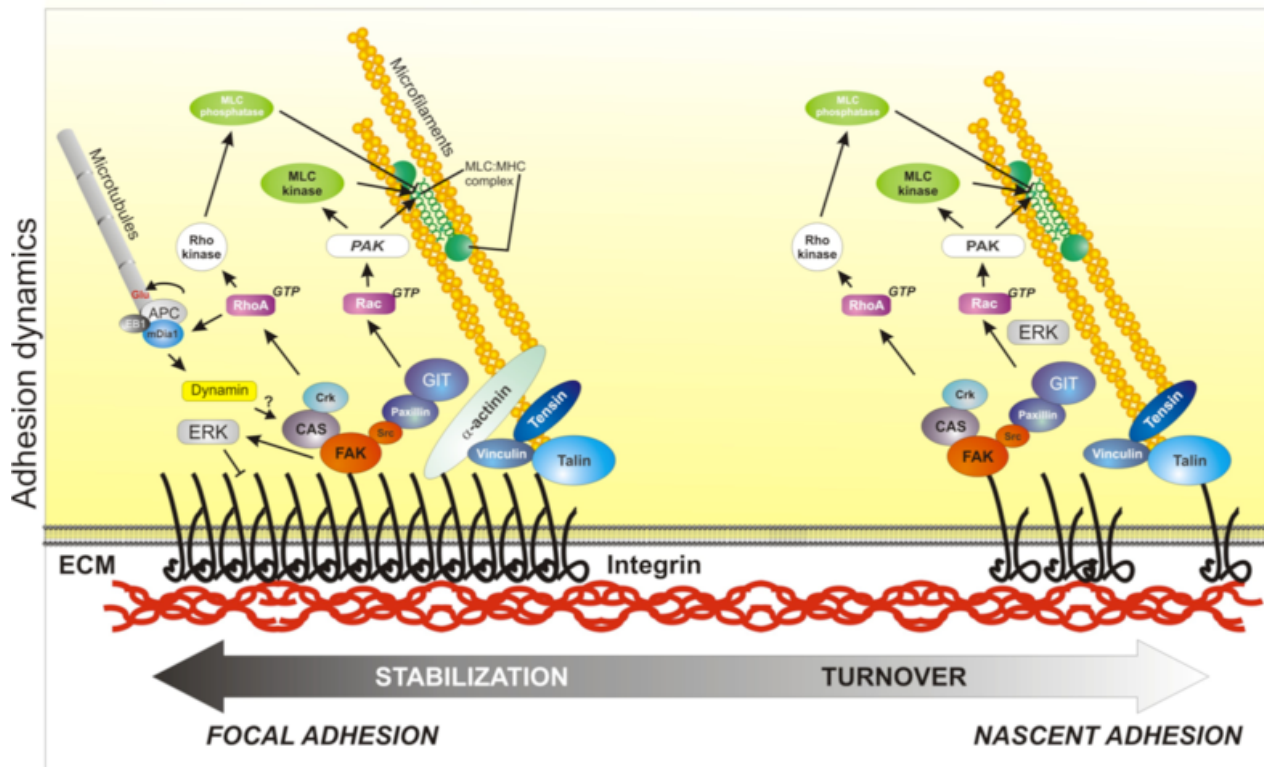


Figure I.2.2.a Schéma représentant un des chemin de signalisation menant aux adhésions focales ou complexes. La matrice extracellulaire est représentée en rouge, les intégrines sont en noires (Vicente-Manzanares et al., 2005).

Cependant, bien qu'exerçant la même fonction, partager le même ligand (la fibronectine) suggère que différents type d'intégrines peuvent coopérer. La conséquence de ce partage de liaison à la MEC, spécifiquement dans la génération de forces et les réponses de mécanotransduction, reste à être explorée.

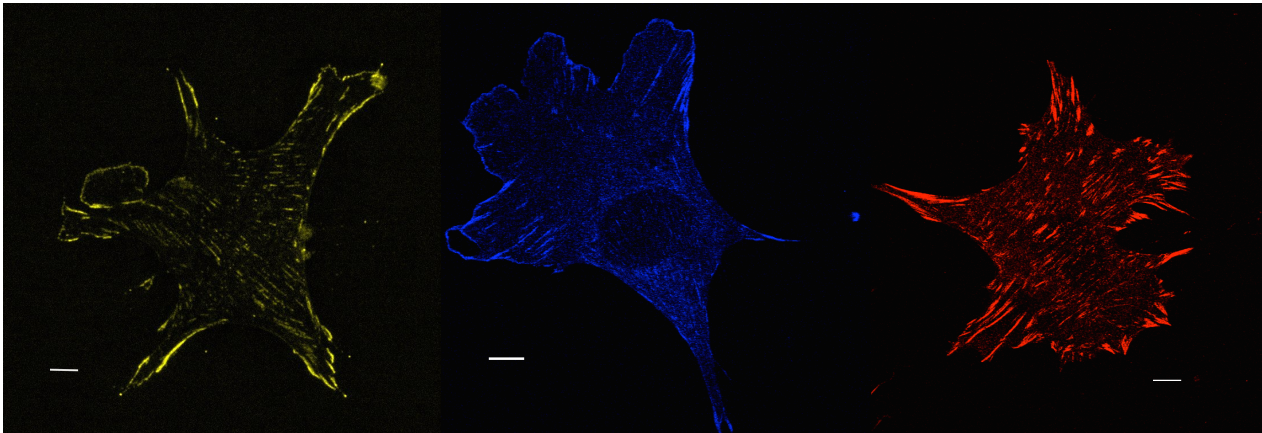


Figure I.2.2.b Plusieurs molécules différentes telles que la paxilline, la taline et la vinculine (De gauche à droite) participent à la formation des adhésions focales. Bar d'échelle 18 μ m).

2.3 Les intégrines et leurs régulations

2.3.1 Les intégrines: des mécanorécepteurs

Les intégrines sont des mécanorécepteurs hétérodimériques transmembranaires composées d'une unité alpha et d'une unité bêta formant, de l'échelle nano à microscopique, le coeur adhésif des sites d'adhésions (Albigès-Rizo et al, 2009). Il y a 18 sous-unités alpha et 8 sous-unités bêta connu qui une fois combinées forment au moins 24 hétérodimères (Hynes et al, 2002). Chaque hétérodimère consiste en un large domaine extracellulaire (80-150 kDa) qui lie les protéines de l'environnement extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique intracellulaire (10-70 acides aminés) qui forme le lien avec les éléments du cytosquelette via des adaptateurs moléculaires cytoplasmiques.

Bien que la diversité d'intégrine permette de reconnaître différents ligands de la MEC (collagène, laminine ou fibronectine), plusieurs hétérodimères sont capables de lier le même ligand (Humphries et al, 2006). Par exemple la fibronectine est reconnue par 8 hétérodimères incluant les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$.

Les intégrines fournissent ainsi le lien physique entre des protéines spécifiques de la MEC et l'actine cytoplasmique permettant de contrôler des fonctions cellulaires et biologiques telles que l'adhésion, la migration, la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Schwartz et al, 1995).

Lors de la formation des contacts adhésifs, les intégrines suivent un cycle mécanique (Puklin-Faucher et Sheetz, 2009): les intégrines lient la MEC et le cytosquelette, transforment les forces mécaniques en signal biochimique intracellulaire, se regroupent et forment les complexes d'adhésion qui grandissent là où la force augmente puis se détachent et sont recyclées. Cependant il existe des différences fonctionnelles entre les différentes intégrines: il a été observé que sous l'action d'une force, les liaisons de $\beta 1$ se renforcent tandis que les liaisons des intégrines $\beta 3$ serait plutôt impliquées dans la réponse adaptative à une augmentation de la force appliquée (Roca-Cusach et al, 2009 ; 2012). Ce qui pourrait expliquer le rôle des intégrines $\beta 1$ dans la génération des forces et celui des intégrines $\beta 3$ dans la transduction des signaux biochimiques.

2.3.2 La taline et la kindline: des activateurs d'intégrines

La plupart des intégrines ne sont pas constitutivement actives. Elles sont souvent exprimées à la surface des cellules dans un état présumé inactif qui ne leur permet pas d'interagir potentiellement avec leurs ligands ni d'initialiser une signalisation. L'activation des intégrines repose sur le changement de leur conformation vers un état de forte affinité envers le substrat (Shattil et al, 2010).

Mon travail de thèse portant essentiellement sur la génération de forces cellulaires par les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$, je ne rentrerai pas dans les détails structuraux de la taline ou la kindline. Des études ont montré que de nombreuses protéines lient la partie cytoplasmique bêta de l'intégrine (Legate et Fassler, 2009). Il existe entre autre, deux régions bien définies de la queue cytoplasmique bêta (les motifs *membrane proximal* NpxY et *membrane distal* NxxY) qui servent de sites d'adhésions pour un certain nombre de protéines liant l'intégrine, incluant la taline et la kindline permettant ainsi la médiation et la régulation de ses fonctions (Figure I.2.3.a ; Calderwood et al, 2003). La taline liant principalement la membrane proximal et la kindline la membrane distal de la queue cytoplasmique des intégrines.

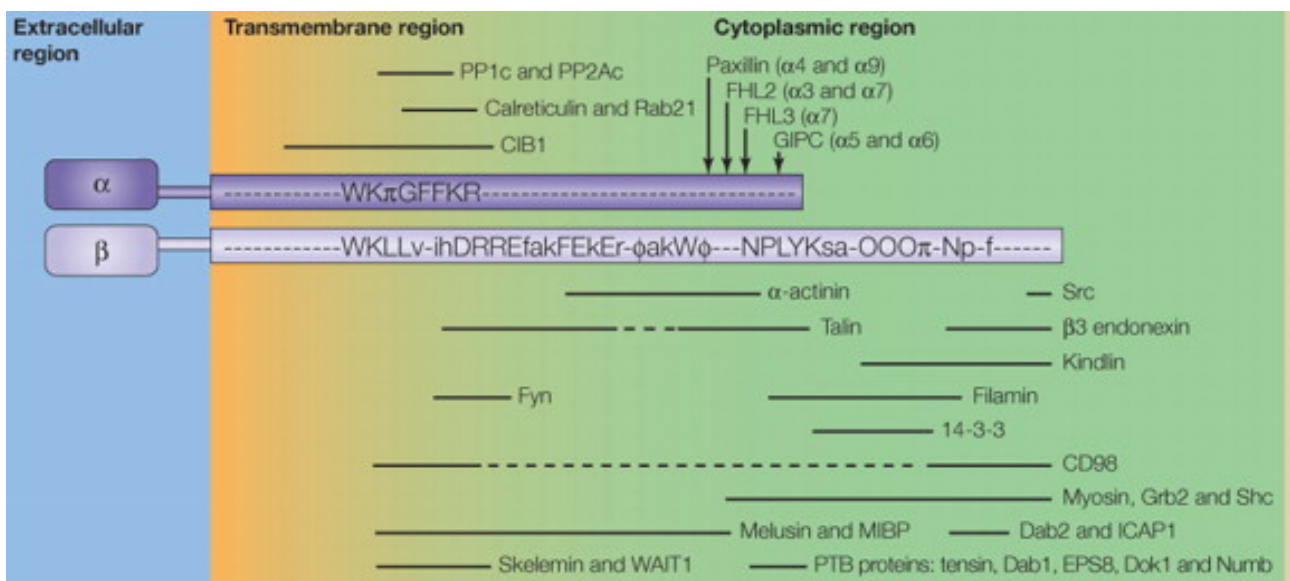


Figure I.2.3.a Schéma de la queue cytoplasmique de l'intégrine $\beta 3$. La longueur de la queue des intégrines étant courte au vu du nombre de partenaires de liaison, des chevauchement existent entre les sites de liaisons de ces différents adaptateurs. (Calderwood et Harburger, 2009).

La taline

La taline est une protéine essentielle dans l'activation de l'intégrine et son lien avec le cytosquelette d'actine. Liant de nombreuses molécules présentes dans les adhésions focales (vinculine, FAK...), la taline permet non seulement l'activation des intégrines, telle que $\alpha 5\beta 1$ (Calderwood et al, 2004) mais aussi le renforcement du cytosquelette et la formation des adhésions focales (Roca-Cusach et al, 2009). En effet il a été montré qu'en l'absence de la taline, les fibroblastes s'étalent mais se rétractent ensuite et s'arrondissent au lieu de développer des adhésions matures (Zhang et al, 2008). Par ailleurs, le rôle de la taline a également été démontré dans l'établissement des premiers liens mécaniques et la génération de forces cellulaires (Giannone et al, 2003).

La kindline

Le rôle important de la kindline dans l'activation de l'intégrine n'a été montré que très récemment. D'après des expériences *in vivo et in vitro*, la kindline est aussi cruciale pour l'activation des intégrines, en effet il a été démontré que bien que la kindline lie directement la queue des intégrines bêta, la perte de la kindline induit un défaut d'activation des intégrines $\beta 3$ (Moser et al, 2008). Seulement la liaison à la taline est nécessaire pour l'activation de l'intégrine, révélant le rôle potentiel de co-activateur de la kindline.

Régulation et activation des intégrines

Ainsi la taline et la kindline lient toutes les deux deux régions distinct de la partie cytoplasmique de bêta et coopèrent ensemble pour réguler l'affinité des intégrines (Calderwood et al, 2013 ; Montanez et al, 2008 ; cf Figure 1.2.3.b). Plusieurs études ont montré que l'interaction taline-intégrine est également régulée via la phosphorylation de la tyrosine des sites NPxY (Calderwood et al, 2013 ; Anthis et al, 2009 ; Legate et Fassler, 2009). En effet la phosphorylation ou

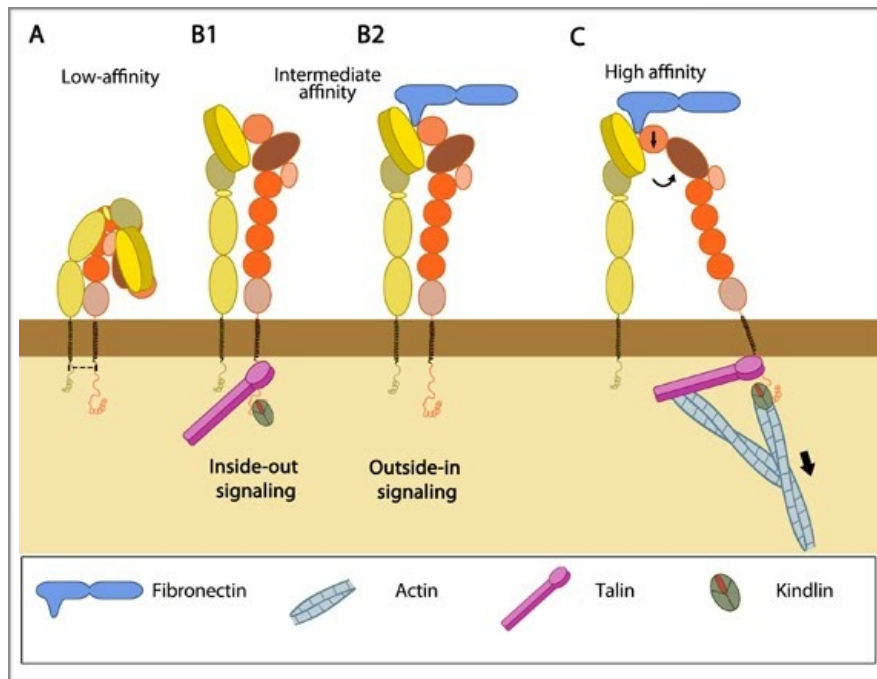


Figure I.2.3.b L'interaction de la taline et/ou de la kindline induit un changement de conformation des intégrines de la basse vers la haute affinité leur permettant de se lier aux protéines de la matrice extracellulaire. A) L'intégrine n'est pas activée, B1 ou B2) L'intégrine peut-être activée de l'intérieur via la taline et/ou kindline ou par l'extérieur via la MEC C) L'intégrine est activée, elle peut transmettre de l'information biomécanique entre le cytosquelette d'actine et la MEC (<http://www.mechanobio.info/topics/signaling>).

la déphosphorylation change l'état de conformation des protéines ou permet leur liaison avec d'autres partenaires moléculaires. Il a notamment été montré que la phosphorylation peut être inhibée en mutant la tyrosine par une phénylalanine et que cette inhibition augmente l'affinité entre la taline et l'intégrine (Legate et Fassler, 2009). Cependant le couplage entre les intégrines, la taline et la kindline dans la génération de forces restent à être exploré.

2.4 Interaction cellule-cellule: les cadhérines

Les cadhérines constituent une famille riche de plusieurs classes de protéines transmembranaires dont le domaine extra-cellulaire est responsable d'interaction calcium-dépendantes² avec des protéines homophiliques³ de la surface cellulaire opposées (Lecuit et Lenne, 2007). Chaque cellule exprime à sa surface plusieurs cadhérines différentes, dont la combinaison et les proportions contrôlent le tri des cellules les unes par rapport aux autres, conduisant à la formation de liaisons cellulaires essentiellement homotypiques⁴ (Steinberg et Foty, 2005).

Les cadhérines régulent les contacts entre les cellules en établissant un lien direct entre une molécule de cadhérine ancrée dans la membrane de la cellule adjacente et le squelette interne de la cellule (Figure 1.2.4). Les jonctions intercellulaires, fortement connectées au cytosquelette d'actine et formées par le regroupement local de cadhérines, sont le lieu principal de la transmission des forces mécaniques à l'intérieur des tissus. Dans les cellules endothéliales, les cadhérines endothélium vasculaire (VE) jouent un rôle majeur dans la formation des jonctions d'adhérences. Les VE-cadhérines régulent divers aspects incluant l'intégrité vasculaire, la perméabilité et la morphogénèse des vaisseaux.

Les VE-cadhérines sont aussi impliquées dans la transmission de forces puisqu'elles régulent également le réseau d'actine, le remodelage dynamique des jonctions d'adhérence étant intimement associé à l'apparence des fibres contractiles d'actines (Lampugnani et al, 2002).

Les cadhérines peuvent aussi interagir entre elles par des interactions hétérotypiques ou avec d'autres molécules telles que les intégrines montrant

² La liaison du Ca^{++} aux 5 domaines EC induit un changement conformationnel qui permet la dimérisation. Elles peuvent alors se lier aux domaines EC de cadhérines d'une cellule adjacente.

³ Interactions qu'établit une molécule d'adhésion à la surface d'une cellule quand elle se fixe au même type de molécule à la surface d'une autre cellule

⁴ Le type de cellules liées sont identiques

l'existence d'un couplage entre les cadhérines et les intégrines. Une étude mettant des cellules en suspension et stimulant des intégrines au moyen de billes recouvertes de fibronectine a montré que la stimulation des intégrines renforçait l'adhésivité intercellulaire des cadhérines illustrant un dialogue entre ces récepteurs dans la mécanique de l'adhésion (Martinez-Rico et al, 2010). Il a été également montré que les forces transmises à l'interface cellule/cellule augmentaient avec la rigidité du substrat (Ladoux et al, 2010). Et que cette force d'interaction dépendait du niveau d'expression et de la fonction des cadhérines à la surface cellulaire et du temps de contact entre les cellules (Chu et al, 2004).

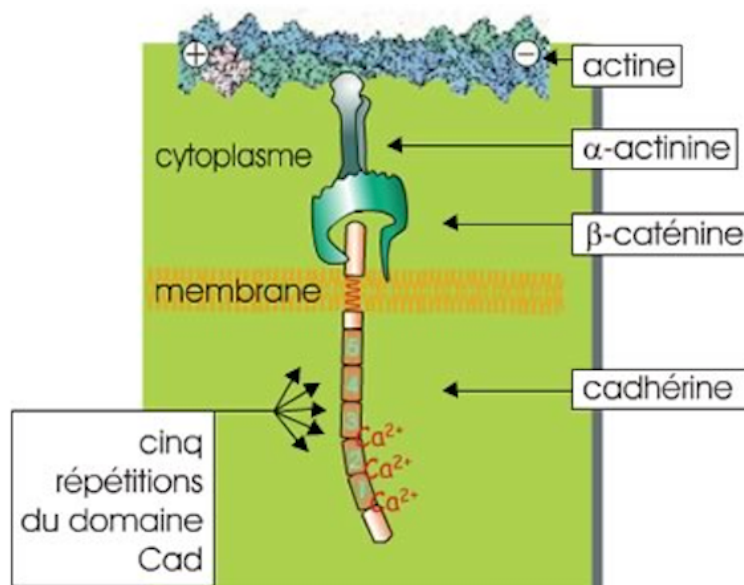


Figure I.2.4 La cadhérine, molécule d'adhérence connectée au cytosquelette. Les cadhérines sont composées d'une partie extracellulaire constituée de cinq domaines capable d'interagir avec une molécule identique portée à la surface de la cellule voisine. Elle possède aussi un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique capable de recruter des connecteurs au cytosquelette comme la β -caténine ou l' α -actinine et d'activer des cascades de signalisation cellulaire (http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.103.b3/content/access.htm).

Le maintien fonctionnel d'un tissu repose donc sur la capacité des cellules, au sein d'un tissu, à réguler les forces qu'elles exercent sur les sites adhésifs (jonction cellule/cellule et cellule/substrat) et l'expression des protéines impliquées dans ces derniers.

3. Mécanique cellulaire: génération de forces et mécanotransduction

La cellule est donc non seulement capable d'exercer des forces mais également de sonder son micro-environnement et de répondre à la résistance

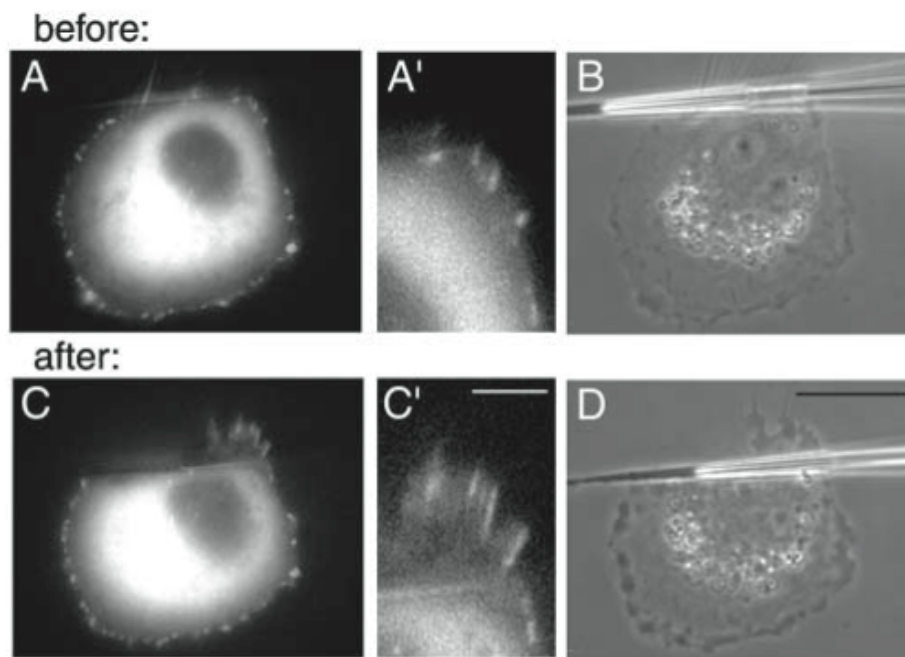


Figure I.3.1 Croissance des adhésions focales sous l'effet d'une force externe appliquée à l'aide d'une micropipette: images de la cellule avant (haut) et après (bas) l'application de la force. A) et C) : visualisation de la répartition de GFP-vinculine A') et C') : grossissements de la zone sous contrainte) ; B) et D) : image de la cellule en transmission d'après (Riveline et al, 2001).

mécanique du matériau qu'elle rencontre à travers un système mécano-chimique incluant des récepteurs adhésifs, le réseau du cytosquelette et des moteurs moléculaires. La rigidité de la matrice sur laquelle les cellules adhèrent et se déplacent peuvent ainsi modifier ces interactions et induire une réorganisation interne de l'architecture cellulaire (Chen, 2008). Ceci se résume sous le concept de mécanosensibilité cellulaire ou encore mécanotransduction. La mécanique et la dynamique de ces systèmes permet aux cellules de contrôler leur forme et de générer des forces. Comprendre comment les forces sont senties ou générées par les cellules puis traduites par les protéines est une des questions essentielles dans le domaine de la mécanique cellulaire. Acquérir des connaissances sur le rôle joué par les forces cellulaires et le comportement des tissus nécessite de trouver les facteurs qui contribuent à la génération de forces dans la cellule.

Dans les cellules adhérentes, les forces sont générées par les deux processus suivant: le continuels assemblage et désassemblage des fibres d'actines et par le système actomyosine qui est principalement conduit par l'interaction entre la myosine II avec l'actine. Ces forces sont ensuite transmises à travers des sites d'adhésions sur le substrat sous-jacent, résultant en sa déformation.

Des études ont mis en évidence que les forces de traction exercées par la cellule sur la MEC ou aux jonctions intercellulaires contrôlent la maturation ou le désassemblage des molécules d'adhésions (Riveline et al, 2001 ; cf Figure I.3.1) et initient les cascades de signalisation intracellulaire menant à l'altération de beaucoup de fonctions cellulaires (Vogel et Sheetz, 2006).

La capacité des cellules à pouvoir sentir les propriétés mécaniques de leur environnement est une caractéristique essentielle de l'homéostasie tissulaire, processus basée sur la relation bidirectionnelle entre l'architecture du cytosquelette et les forces mécaniques générées par les cellules (Figure I.3.2).

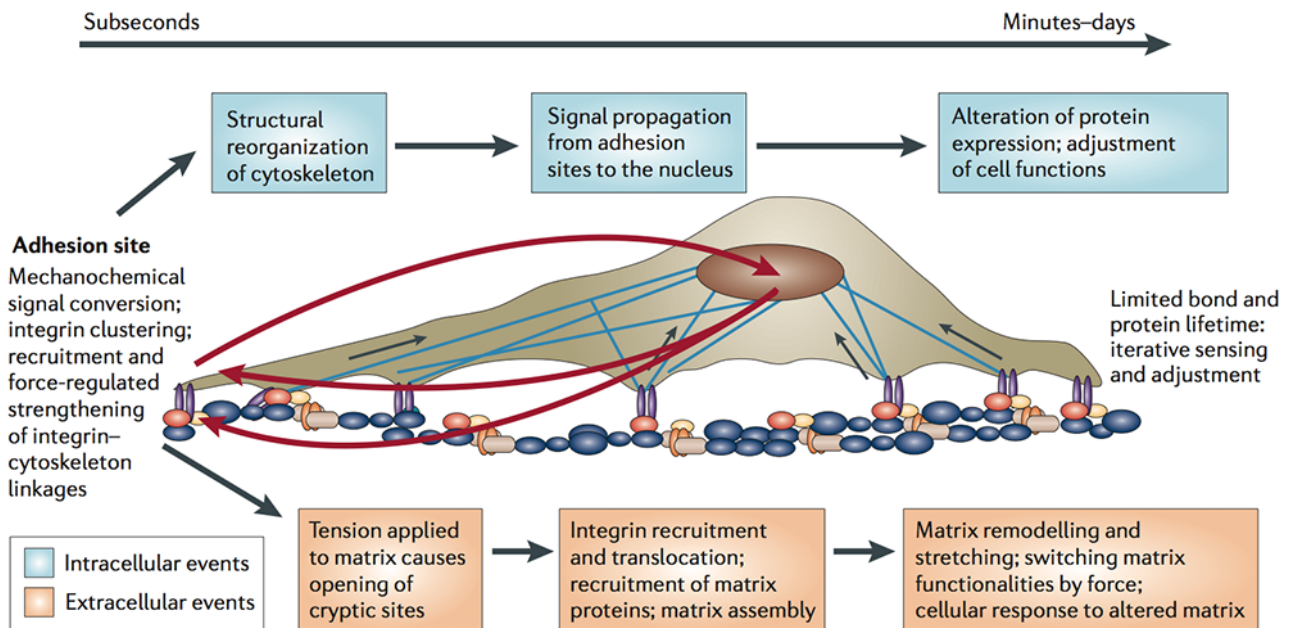


Figure I.3.2 Processus cellulaire de la mécano-sensibilité au cours du temps (Vogel et Sheetz, 2006). Les cellules sentent leur environnement mécanique provoquant des cascades de signalisation intracellulaire et extracellulaire.

C'est pourquoi il apparait crucial de comprendre le lien entre l'architecture cellulaire et les forces de traction impliquées afin de mieux identifier le processus de mécanosensitivité des cellules.

4. Objectifs

Des études récentes ont montré le rôle majeur des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ comme étant des régulateurs clés dans la mécano-sensation cellulaire (Roca-Cusach et al, 2009 ; Figure I.4). En effet il a été montré, grâce à la technique des pinces magnétiques, que les intégrines β_1 et β_3 sont responsables de la mécanosensibilité et plus particulièrement que l'intégrine β_1 serait responsable de la génération de forces tandis que l'intégrine β_3 permettrait le renforcement

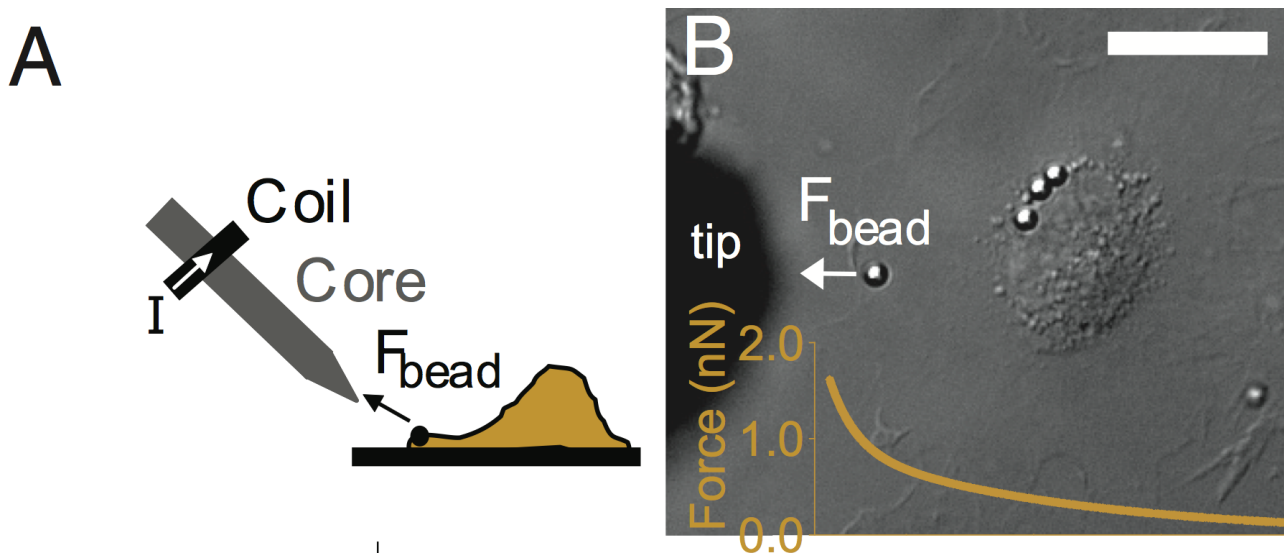


Figure I.4 Dispositif expérimental (Roca-Cusach et al, 2009). A) Diagramme montrant les pinces magnétiques. Un courant (I , flèche blanche) traverse la bobine placée autour du coeur magnétique ce qui crée un gradient magnétique autour de la pointe. La force exercée sur la bille (F_{bead}), qui augmente avec ce gradient, est plus forte quand la bille et la pointe magnétique sont proches. B) Image en DIC (Differential interference contrast: DIC) montrant la pointe magnétique, une cellule et une bille magnétique attachée fonctionnalisée avec de la fibronectine. La force exercée sur la bille par l'aimant tire la bille vers le bord de la cellule. Le graphique du bas nous montre la dépendance de la force appliquée en fonction de la distance à la pointe. Bar d'échelle: 20 μm .

des adhésions et serait impliquée dans la sensibilité aux propriétés physiques du micro-environnement. Bien que cette méthode permette de quantifier localement les forces cellulaires, il serait intéressant de les quantifier également à l'échelle globale de la cellule. En effet, des études (Trichet et al, 2012) ont suggéré que la mécanotransduction pouvait être un processus impliquant l'intégralité de la cellule. Par ailleurs c'est une technique dite « active » utilisant une sonde locale appliquée sur la surface dorsale des cellules.

L'idée principale de cette thèse est donc d'utiliser des approches génétiques et des techniques « passives » de quantification des forces dans le but de quantifier les forces de traction sur la globalité de la cellule afin de mieux comprendre le processus de la mécanotransduction à travers les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la génération de forces ainsi que les voies de signalisation impliquées dans leur interaction.

Pour cela, le deuxième chapitre de cette thèse sera tout d'abord consacré à la description des méthodes et outils expérimentaux utilisés dans ces travaux. Dans cette partie nous allons détailler notre modèle biologique, notre technique de fabrication des gels et de quantification des forces cellulaires ainsi que de les différents algorithmes utilisés pour l'analyse des données.

Le troisième chapitre, partie centrale de mon travail, aborde la question du couplage des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la mécanotransduction. Plus précisément, en combinant la technique de microscopie à traction de force à des approches génétiques nous avons voulu comprendre comment les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ coopèrent pour moduler les forces et comment elles se partagent le travail dans les processus de mécano-sensation et de mécano-réponse. Nos résultats montrent que, alors que l'intégrine $\beta 1$ a une fonction essentielle dans la génération de forces, l'intégrine $\beta 3$ quant à elle joue un rôle de régulateur négatif

sur l'intégrine $\beta 1$ en affectant sa distribution spatiale au sein de la cellule à travers sa capacité à lier la taline et la kindline. Et enfin que l'intégrine $\beta 3$ est un régulateur temporel de l'activité contractile de la cellule générée par l'intégrine $\beta 1$.

Le quatrième chapitre explore la formation de la lumière aortique et notamment la force intercellulaire générées par les cadhérines au niveau des tissus la composant, dans le cadre d'un travail effectué en collaboration avec le groupe du Prof. Lars Holmgren (Karolinska Institut, Suède). Pour cela nous avons effectué des mesures de forces de traction au sein de doublet de cellules par TFM. Nous avons trouvé que l'angiomotine, jouant un rôle important dans la migration des cellules endothéliales est aussi impliqué dans la formation de la lumière aortique. En effet nous avons montré que l'angiomotine et plus précisément la protéine AmotL2 faisait le lien entre les cadhérines endothéliales vasculaires et les fibres d'actines contractiles afin de permettre l'extension de la lumière aortique nécessaire pour la circulation sanguine.

Dans le dernier chapitre nous nous sommes servi de la microscopie à traction de force comme outil de diagnostic médicale dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Najet Debili (institut Gustave Roussy de Paris), en nous intéressant à la formation de pro-plaquettes anormales dans le syndrome MYH9. En effet les patients atteints de ce syndrome présentent un faible nombre de plaquettes sanguines conduisant à de haut risque d'hémorragie. La myosine a précédemment été identifiée comme étant indispensable pour la formation des plaquettes. Dans cet article nous avons montré que l'anomalie dans la formation des proplaquettes résultait de l'augmentation de la contractilité de l'actomyosine et qu'elle est rétablie par l'inhibition de la myosine IIA.

Chapitre II. Outils et techniques expérimentales

Beaucoup d'études dans le domaine de la biomécanique tentent de corréler les réponses fonctionnelles ou structurelles des cellules telles que l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose à la mesure de force.

Un certains nombres d'approches ont été mises au point ces dernières années afin de faire le lien entre les propriétés physique de la MEC et l'architecture interne de la cellule et leurs forces connexes. Classiquement les cellules eucaryotes sont cultivées au fond de boîtes de pétri en plastique ou sur des lamelles de verre traitées pour que les cellules puissent adhérer ce qui empêche de cartographier les forces contractiles à la surface basale des épithéliums. Par ailleurs ces substrats présentent une rigidité quasi infinie à l'échelle cellulaire, or on sait que le comportement des cellules est influencé par la surface sur laquelle elles adhèrent. Le fait d'avoir un substrat qui permette de contrôler l'interaction d'assemblées de cellules in vitro ainsi que de pouvoir cartographier le champ de traction devient nécessaire. La plupart de ces approches sont basées sur la mesure des forces de traction via un substrat élastique, le capteur de forces étant la surface entière du substrat. L'une des premières technique repose sur la mesure des distortions d'un substrat de silicone en réponse aux forces exercées par la cellule (Harris et al, 1980). Par la suite, afin d'améliorer la résolution spatiale, des techniques basées sur la mesure du déplacement des billes au sein d'un substrat de silicone (Dembo et al, 1996 ; Dembo et Wang, 1999) sont apparues. Parallèlement à celles-ci des techniques utilisant une surface micro-structurée de PDMS ou utilisant des points fluorescents fabriqués par lithographie améliorant encore la résolution spatiale par rapport aux techniques précédentes, ont été conçues (Balaban et al, 2001). Cependant, les substrats de silicone n'offrent qu'une gamme limité de rigidité. Or selon le type cellulaire, la rigidité requise peut varier énormément (Moore et al, 2010 ; cf Figure II.1). Des substrats en polyacrylamide ont alors été proposés (Pelham et Wang, 1997), ceux-ci ayant non seulement de meilleurs propriétés optiques et mécaniques mais pouvant

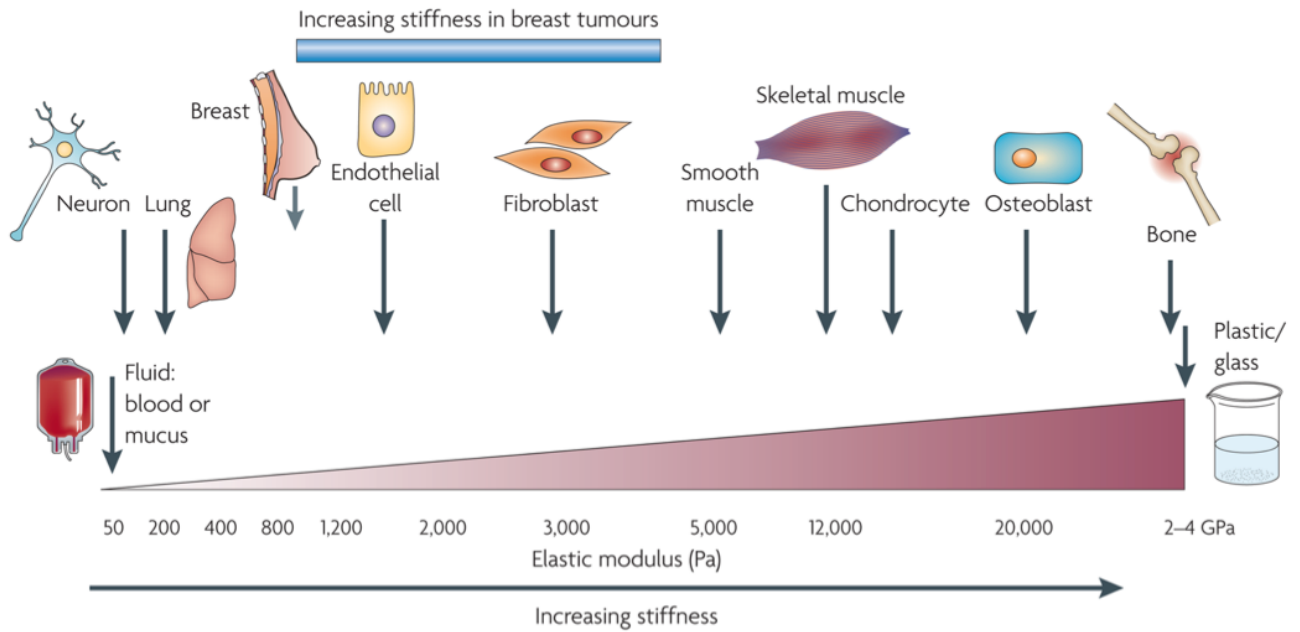


Figure II.1 La rigidité physiologique de différents tissus et type cellulaire. Schéma extrait de Butcher et al, 2009. Chaque type de cellule est spécifiquement adapté au tissu spécifique dans lequel il réside.

aussi être fonctionnalisés avec des protéines de la MEC. Cette méthode nous permet d'accéder aux champs de déplacement, de traction mais aussi au champ de pression lors du calcul des forces de traction (Dembo et Wang, 1999; Beningo et al, 2001).

Par ailleurs des techniques dites discrètes ont également été conçues pour sonder les forces de traction. La première fut basée sur un substrat (silicone et laminine) contenant des micro-leviers (MEMS) qui lors de leur déflexion nous permettent d'accéder rapidement aux forces (Galbraith et Sheetz, 1997). Malheureusement la fabrication des MEMS étant très onéreuse, d'autres substrats composés de PDMS avec des micro-aiguilles (Tan et al, 2003 ; cf Figure II.2) ou des micropiliers ont été fabriqués.

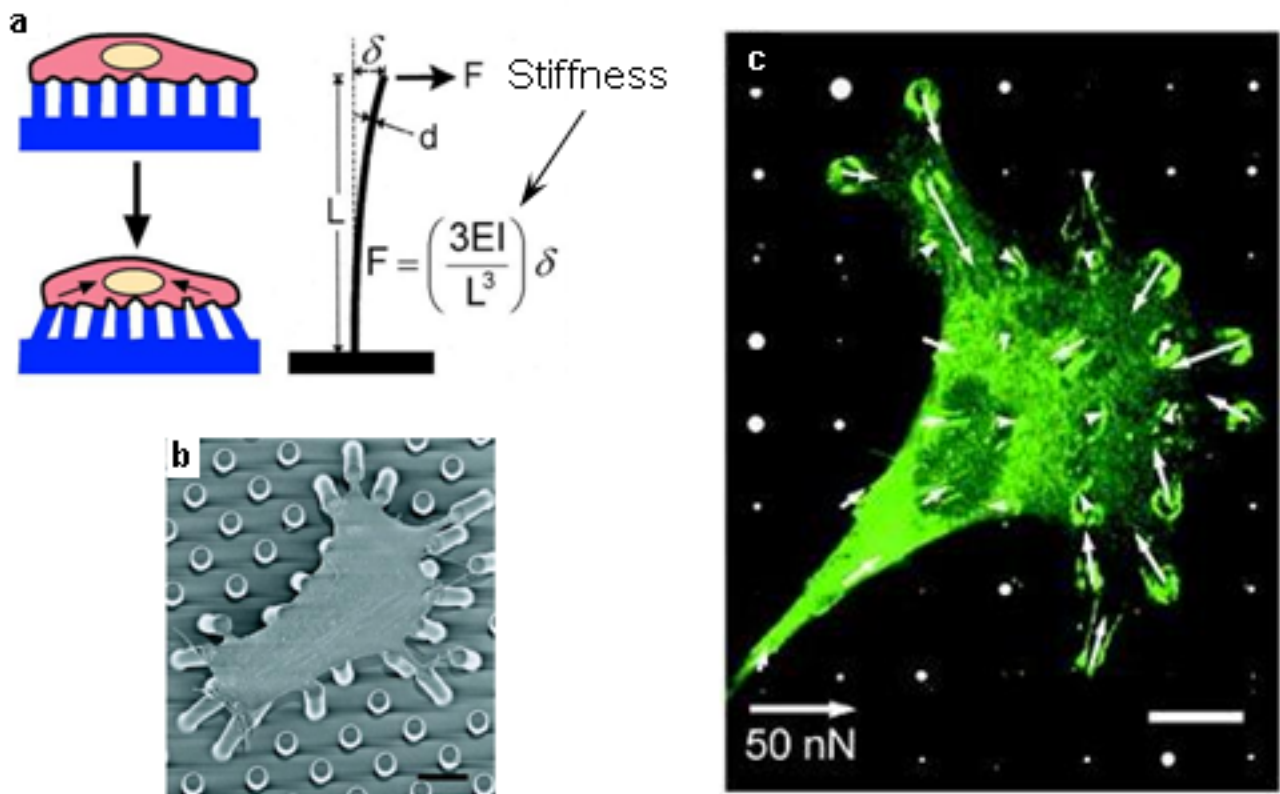


Figure II.2 Cellule étalée sur un substrat de micro-piliers (bar = 10 μm): a) Diagramme illustrant la méthode de calcul des forces ($d = 2\text{-}10\ \mu\text{m}$, $L = 3\text{-}50\ \mu\text{m}$, spacing = 6-10 μm). b) Image de la cellule déformant les plots durant l'adhésion (SEM). c) Carte du champ de traction et des adhésions focales (vinculine) marquée en vert (adaptée de Tan et al., 2003).

Dans cette thèse nous proposons d'utiliser la microscopie à traction de force (Dembo et al, 1996) qui se positionne comme l'une des techniques les plus robustes pour cartographier le champ de traction de cellules adhérant sur des substrats déformables continus.

1. La microscopie à traction de forces: aspects théoriques

La technique de TFM présente les avantages suivant: c'est une technique de type « passive », c'est à dire que l'on collecte les forces transmises par les cellules sans les stimuler, elle prend en compte la cellule dans son intégralité, la mesure des forces se fait alors sur la globalité de la cellule. De plus, cette une méthode nous donne accès à une grande statistique puisque des mesures sur un grand nombre de cellules peuvent être effectuées en un temps court, ce qui est important dans l'étude des phénomènes biologiques.

Le principe de cette technique repose sur l'imagerie, via un microscope inversé, de nano-billes (200nm) fluorescentes immergées au plus proche de la surface libre d'un gel élastique homogène et continu, sur lequel sont cultivées des cellules adhérentes. En suivant le déplacement de ces billes en réponse aux forces développées par la cellule, cet outil permet de mesurer le champ de déplacement au niveau des liaisons cellule/substrat avec une très grande résolution spatiale (40nm) et donc de calculer les forces avec une grande précision ($<nN$) (Figure II.1.1).

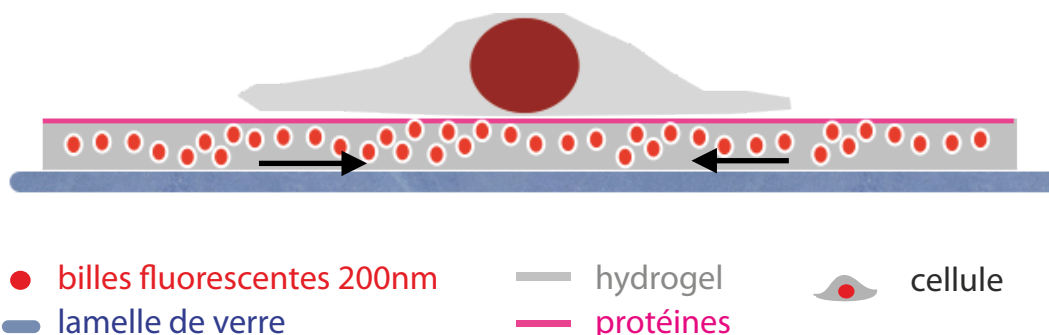


Figure II.1.1 Schéma simplifié du principe de la TFM: gel de PAA contenant des nano-billes fluorescentes sur lequel sont déposées les cellules dont on veut ³⁹estimer les forces de traction.

La déformation du substrat apparaissant sous l'effet de forces appliquées à sa surface, la théorie de l'élasticité linéaire nous dit que le champ de déplacement est en fait une convolution entre la fonction de Green G (définissant la réponse du matériau à une force ponctuelle) et le champ de traction T suivant la relation:

$$u_i(\mathbf{r}) = \int \Sigma_j G_{ij}(\mathbf{r}-\mathbf{r}') T_j(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'$$

Où u_i est le déplacement, G_{ij} une fonction de Green et T_j la force appliquée.

Dans notre étude, plusieurs hypothèses sont faites:

- le gel est considéré comme un substrat élastique, isotrope et incompressible;
- les forces sont considérées comme tangentes à la surface du substrat ce qui réduit notre problème à deux dimensions: x et y , car le déplacement de la cellule est considéré comme plan;
- la taille des adhésions (μm^2) est considérée comme très petite devant l'épaisseur des films ce qui permet de faire l'hypothèse que le substrat constitue un milieu élastique semi-infini.

Nous supposons que le substrat est incompressible, ce qui permet de déduire le coefficient de Poisson qui caractérise la contraction de la matière perpendiculairement à la direction de l'effort appliqué: il est égal à 0,5.

En faisant toutes les hypothèses ci-dessus, la fonction de Green est alors celle de Boussinesq:

$$G_{ij}(r) = \frac{1+\nu}{\pi E r^3} \begin{bmatrix} (1-\nu)r^2 + \nu x^2 & \nu xy \\ \nu xy & (1-\nu)r^2 + \nu y^2 \end{bmatrix}$$

Où E est le module d'Young et ν le ratio de Poisson du substrat considéré.

A partir de la mesure des déplacements en des points discrets de l'espace, on cherche alors à calculer le champ de traction, pour cela il faut inverser la matrice qui relie les déplacements $\mathbf{u}(\mathbf{r}_n)$ aux forces. Dembo et Wang (Dembo et Wang, 1999) ont développé un algorithme permettant de faire cette inversion matricielle directement. Cependant, le problème inverse est très sensible au bruit de la mesure du champ de déplacements étant donné que la fonction de Green varie en $1/r$. Des solutions ont été proposées mais le problème majeur réside dans le fait que dans l'espace réel ce calcul s'avère long en raison de la difficulté à inverser un très grand nombre de matrice non diagonales. En 2002, J.P Butler et collaborateur (Butler et al, 2002) ont développé une autre méthode: la FTTC (*Fourier Transform Traction Cytometry*), basée sur une analyse dans l'espace de Fourier, le produit de la convolution devenant un simple produit. Ils ont montré que la matrice reliant déplacement et traction est diagonale dans l'espace de Fourier car il n'y a pas de couplage en fréquences spatiales. Dans ce cas la résolution du problème inverse est largement simplifiée puisqu'il s'agit ici d'inverser une matrice diagonale. Ainsi nous pouvons remonter aux forces de traction cellulaires.

Le fait d'avoir un substrat qui permette de contrôler l'interaction d'assemblées de cellules in vitro ainsi que de pouvoir cartographier le champ de traction devient nécessaire. C'est pourquoi nous utilisons ici la technique de microscopie à traction de force couplée avec l'utilisation d'hydrogels déformables, qui permet de quantifier les forces de traction cellules/substrat ou encore les forces cellule/cellule créées par un doublet.

2. Micro-fabrication: le gel en polyacrylamide

De manière générale, le substrat que nous devons utiliser pour les expériences doit « mimer » l'environnement physiologique cellulaire afin de permettre à la cellule de réaliser ses fonctions de base telles que l'adhésion, la migration ou encore la division. Le gel doit être non toxique, fonctionnalisé et de plus sa rigidité doit être proche de la rigidité d'un tissu (de l'ordre du kPa jusqu'à quelques dizaines de kPa, cf Figure II.1).

Les hydrogels en polyacrylamide (PAA) sont les substrats communément utilisés pour les études en TFM. Ils présentent plusieurs avantages mécaniques, chimiques et optiques (Pelham et Wang, 1997). En effet ce gel est transparent et non fluorescent ce qui facilite la visualisation au microscope des processus cellulaires. De plus, il est possible de fonctionnaliser sa surface avec des protéines afin de créer une surface adhésive contrôlée pour y fixer des cellules, de contrôler la rigidité et d'y ajouter des billes fluorescentes afin de mesurer le déplacement des billes puis de calculer les forces de traction.

La réalisation des hydrogels en PAA nécessite un certain nombre d'étapes que nous allons décrire ci-après. Pour préparer le gel, nous devons d'abord traiter les lamelles sur lesquelles le gel de PAA va adhérer afin que celui-ci colle à cette lamelle. Nous utilisons une lamelle de verre afin d'assurer au maximum la planéité du gel.

Ensuite on prépare la solution de PAA qui est un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide (son réticulant) combinés en solution. Durant cette étape, on ajoute des nano-sphères fluorescentes de 200nm.

Vient ensuite l'étape de polymérisation du gel; pour cela on ajoute deux initiateurs à la solution de PAA: le TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma-Aldrich) et l'ammonium persulfate. On dépose une goutte de la solution de PAA

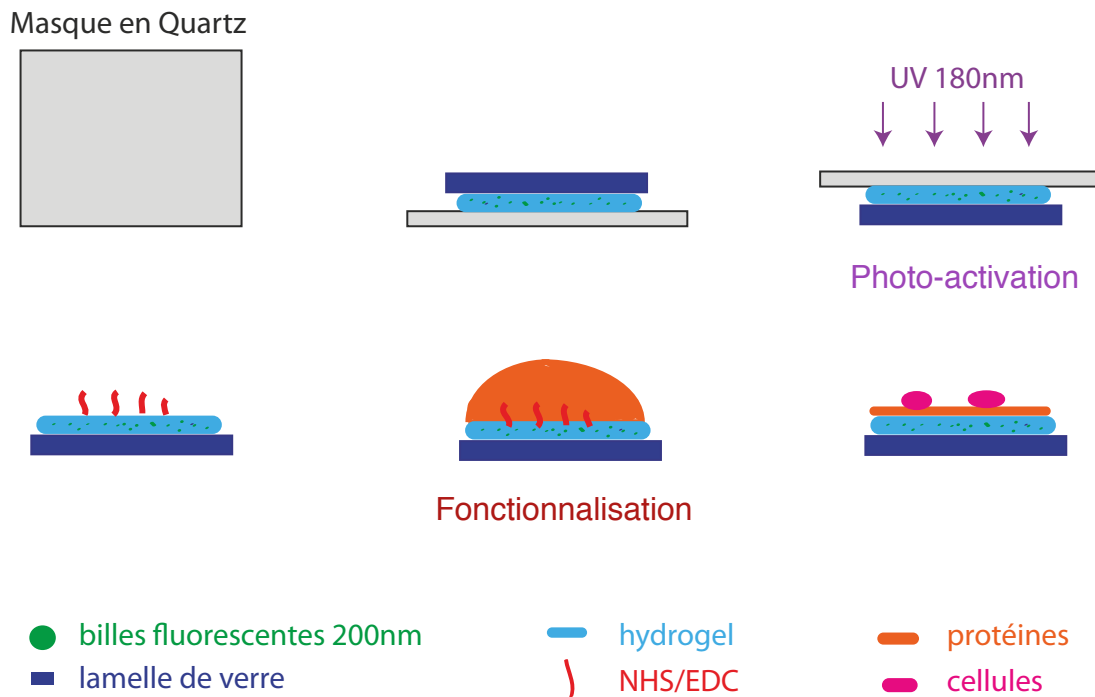


Figure II.2.1. Schéma illustrant la méthode de fabrication des hydrogels pour la TFM.

contenant les billes sur le masque en quartz hydrophobe, préalablement nettoyé au savon et à l'eau chaude, puis on applique la lamelle délicatement par dessus. La procédure de polymérisation dure environ une heure à température ambiante. Ensuite, pour fonctionnaliser le gel nous utilisons une procédure de photo-activation aux UV profonds (180nm). Pour cela, on polymérise le gel directement sur un masque en quartz (Figure II.2.1).

Une fois la polymérisation achevée, on recouvre la lamelle avec quelques millilitres d'eau pure pour faciliter le détachement de la lamelle, puis on décolle doucement la lamelle au scalpel avant de la déposer sur une solution composée de NHS/EDC. Le couplage de protéines d'intérêt à la surface du gel photo-activé est réalisé selon un processus de réticulation utilisant l'EDC (1-Ethyl-3-carbodiimide (3-diméthylaminopropyl)). Après insolation aux UV profonds, on peut utiliser l'EDC comme réticulant entre le gel de PAA et notre protéine d'intérêt: la

fibronectine. En pratique la solution d'EDC n'est stable que quelques minutes à température ambiante. Cependant, grâce au travail du groupe de Staros (Staros et al, 1986), on sait que le NHS (Nhydroxysulfosuccinidimide) peut améliorer le taux de réticulation par l'EDC. Cela assure que le temps de l'incubation soit suffisant (une heure d'après notre protocole) pour coller la protéine d'intérêt sur le substrat du gel de PAA.

Enfin, les protéines d'adhésion au substrat, telle que la fibronectine, sont ajoutées afin que les cellules puissent adhérer au gel. L'homogénéité du *coating* est assurée par l'éclairage homogène du gel à travers le masque.

Finalement, le gel est prêt à recevoir les cellules pour la mesure des forces de traction par TFM (Figure II.2.1).

3. Les techniques de biologie cellulaire

3.1 Culture cellulaire et infections

Afin de comprendre le rôle respectif des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$, le modèle biologique sur lequel nous avons travaillé est les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF). Les MEFs ayant pour fonction la réorganisation de la MEC, se liant très bien à la fibronectine et exerçant des forces de traction. Pour comprendre la fonction spécifique des intégrines nous avons utilisé des approches génétiques et génétiques inverses qui consiste à dépler une protéine et/ou la ré-exprimer sous une forme sauvage ou mutante. Afin d'obtenir la déplétion d'un gène donné, nous utilisons un modèle de cellules transgéniques pour perdre ce gène et pas seulement faire une diminution d'expression des ARNm (SiARN, ShARN).

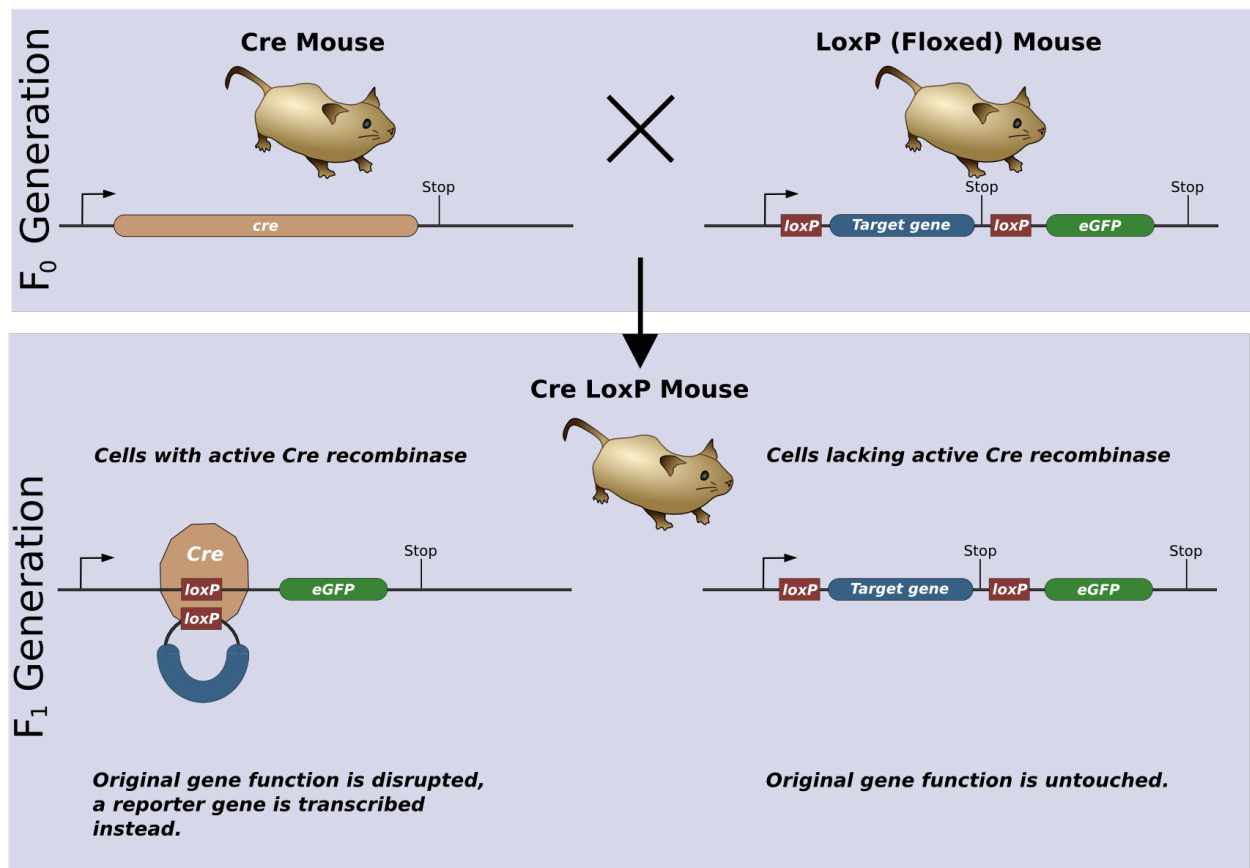


Figure II.3.1 Schéma décrivant l'utilisation du système Cre/Lox. Deux lignées de souris sont nécessaires: les souris ayant des cellules exprimant la protéine Cre et des souris ayant des cellules contenant le gène cible entouré par des sites loxP. Lorsque les souris s'accouplent, les cellules portant la Cre provoqueront la perte de fonction de ce gène cible (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/CreLoxP_experiment.png).

La déplétion d'un gène peut conduire soit à un *knock out* viable, les cellules sont donc constitutivement déplétées (c'est le cas pour les MEF $\beta 3^{-/-}$) ou bien le *knock out* n'est pas viable après déplétion du gène par transgénèse et le système CRE-Lox est utilisé. Ce système est couramment employé pour la fabrication de *knock-out* conditionnel afin d'empêcher l'expression d'un gène et donc de créer des cellules déficientes en intégrines $\beta 1$ ou $\beta 3$ ou encore des cellules contrôles dans lesquelles des intégrines $\beta 1$ ou $\beta 3$ fusionnées à des protéines fluorescentes telle

que la GFP sont exprimées (rescue). Pour cela deux lignées de souris sont nécessaires (Figure II.3.1).

Afin de supprimer un gène d'intérêt (l'intégrine $\beta 1$ par exemple), on introduit deux sites loxP (séquences palindromiques⁵ de 13 pb) autour de la séquence d'ADN où se trouve le gène exprimant cette protéine dans une souris. Dans une seconde souris transgénique on injecte via un adénovirus⁶ de l'ADN contenant la CRE recombinase dirigée par un promoteur spécifique d'un tissu (enzyme Protéine de 38kDa produite par un bactériophage P1 Lox) celui-ci possédant la propriété de catalyser une recombinaison entre deux sites LoxP, c'est à dire de cliver le segment d'ADN compris entre deux sites loxP. Ainsi après l'accouplement, à l'issue de la recombinaison, les séquences comprises entre ces deux sites sont excisées sous la forme d'un ADN circulaire tandis qu'il ne subsiste sur l'ADN cible qu'un seul site LoxP: notre cellule n'exprime plus l'intégrine $\beta 1$. Les cellules ont ensuite été triées par cytométrie en flux (FACS) basé sur le niveau d'expression des $\beta 1$ afin d'obtenir la plus grande population pure de MEF $\beta 1^{-/-}$.

La cytométrie en flux

La cytométrie en flux (Fluorescence-activated cell sorting: FACS) est une technique permettant de compter et de caractériser les cellules individuellement en les faisant défiler à grande vitesse dans un faisceau laser (Figure II.3.2). Ces mesures reposent sur la lumière ré-émise (par diffusion ou fluorescence) permettant ainsi de classer la population suivant plusieurs critères. L'identification morphologique des cellules est faite grâce à la lumière diffractée (aux angles inférieurs à 10°, les signaux optiques sont proportionnels au diamètre des

⁵ Séquence d'ADN pouvant se lire de la même façon dans les deux sens par rapport à un point central

⁶ Virus à ADN

cellules), sa granulosité grâce à la lumière réfléchie (aux angles de 90°, la lumière observée évolue proportionnellement au contenu cellulaire) et par marqueurs cellulaires (la fluorescence étant proportionnelle à l'intensité de marquage). C'est grâce à cette technique utilisant un FACS-trieur que nous avons pu trier nos cellules avec plus de 80% d'expression de la mutation (Figure II.3.2).

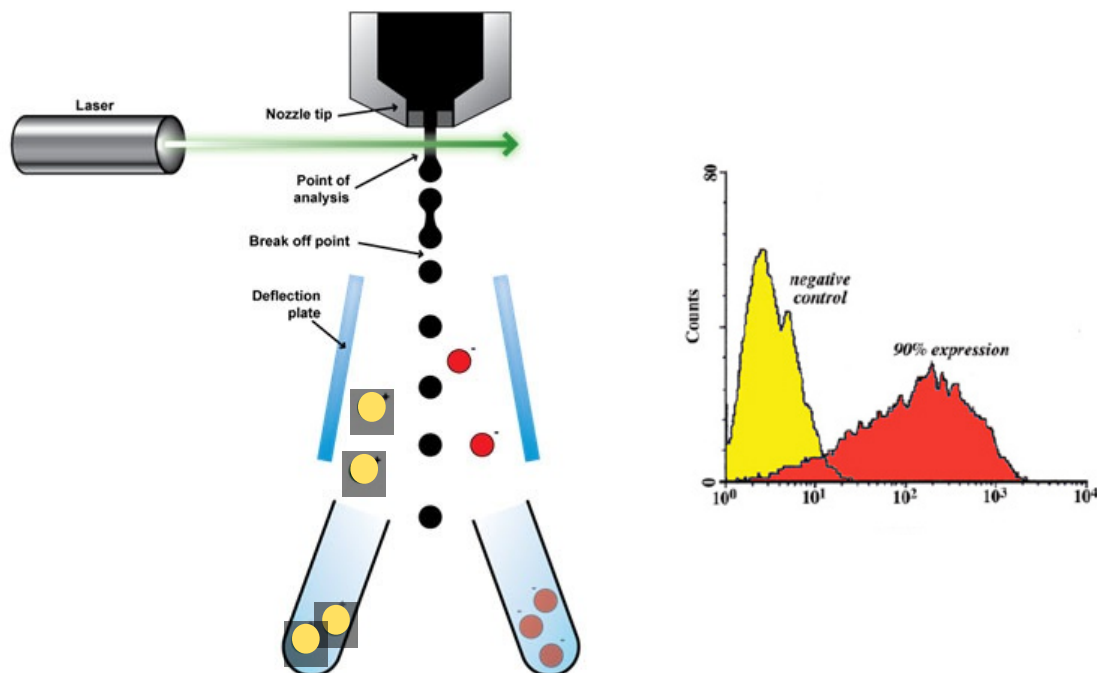


Figure II.3.2 Schéma illustrant le principe de la cytométrie en flux. Les cellules sont triées selon leur intensité de fluorescence (grâce à une protéine GFP par exemple). Ainsi seules les cellules ayant le taux d'expression de la mutation et donc la GFP sont conservées (adapté de abcam.com).

On peut ensuite la faire ré-exprimer en la fusionnant avec une protéine fluorescente par génétique inverse afin d'avoir une expression stable et homogène sur une population de cellule par transduction rétroviral. Pour cela on infecte notre rétrovirus⁷ contenant les intégrines $\beta 1$ -GFP dans les cellules: $\beta 1^{lox/lox+} \beta 1$ -GFP.

⁷ Virus à ARN

Puis ces cellules contrôles sont ensuite triées par FACS-trieur afin d'obtenir des cellules *knock-out* d'expression de surface comparable au niveau d'expression des intégrines de surfaces des cellules clones parents (WT). Après amplification de la population, on infecte les MEFs $\beta 1^{\text{lox/lox}+}$ $\beta 1$ -GFP avec de l'adénovirus codant pour la CRE recombinase ce qui induit la recombinaison de l'ADN entre les sites Lox et l'excision du gène de $\beta 1$. Ce qui nous permet de perdre l'expression de $\beta 1$ endogène tout en conservant une expression exogène de $\beta 1$: $\beta 1^{-/-}$ + $\beta 1$ -GFP.

Afin de comprendre les mécanisme moléculaires sous-jacent au rôle respectifs des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$, différentes mutations de la partie cytoplasmique des intégrines $\beta 3$ utilisées ont été réalisées afin de modifier leur capacité de lier leur partenaires naturels (Legate et al, 2009). Pour cela on utilise la technique de mutagenèse dirigée qui permet d'introduire des mutations sur l'ADN codant pour $\beta 3$ -GFP et inséré dans un vecteur d'expression rétroviral, a été utilisée.

Avant de déposer les cellules sur le gel, les cellules sont au préalable détachées de la boîte de pétri avec de la trypsine. Puis les cellules (environ 60 000 cellules/gel) sont ensuite mises en contact avec le gel placé dans une boîte stérile et laissées environ 16h dans l'incubateur (37°C, 5% de CO₂).

Une fois ce temps écoulé, le gel peut être monté dans une chambre d'observation (POC-R Zeiss) et enfin placée sous le microscope qui est équipé lui même d'un incubateur.

L'hydrogel de PAA doit être observé sous un microscope inverse afin de pouvoir profiter de la faible distance de travail des objectifs à immersion.

3.2 Immunofluorescence

Afin de pouvoir observer les structures biologiques des cellules nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence qui permet de marquer en fluorescence les structures voulues (Figure II.3.3). Les anticorps utilisés pour les immunomarquages ont été obtenus à partir des sources commerciales suivantes: rat anti-activé $\beta 1$ intégrines (9EG7, BD Pharmingen), lapin anti-souris Taline (fabriqué à l'IAB clone J61, décrit dans Martel et al. 2001) et souris anti-rat Kindline2 (clone 3A3, Millipore, Fremont, CA), souris anti-paxilline (BD, Franklin Lakes, NJ). Les anticorps secondaires Alexa 647 et 546 proviennent de Invitrogen.

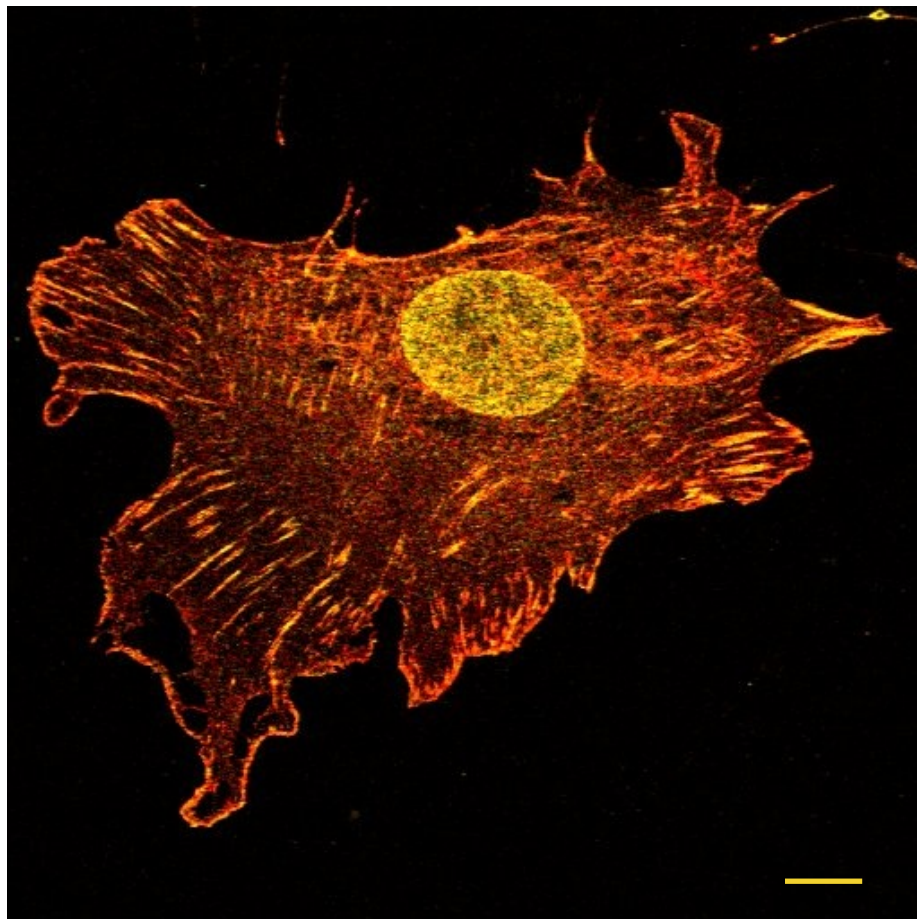


Figure II.3.3 Cellule WT dont les sites kindline (rouge) et taline (jaune) sont marqués par immunofluorescence. Bar d'échelle: 18 μ m

4. Outils d'imagerie et acquisition d'images

4.1 Outils d'imagerie

Les cellules marquées par immunofluorescence ont été imagées avec un microscope confocal Zeiss META équipé d'un objectif 63x à huile apochromat d'un zoom optique de facteur 1,2 et d'un ensemble de filtre détectant spécifiquement les longueurs d'ondes 546 et 633nm.

Les expériences de microscopie à traction de force ont été réalisées en utilisant un microscope inversé Nikon ECLIPSE Ti monté avec une caméra CCD CoolSNAP (Roper Scientific) ou CMOS (Andor) et dirigé grâce à micromanager (<http://www.micro-manager.org>) ou IQ (Andor). Le microscope est également équipé d'une roue de filtre automatique contenant 5 cubes filtres passe bandes. Chaque cube contenant un filtre d'excitation, un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission. Pour les images en champ clair, une LED (CoolLED PE-100 équipée d'un shutter automatique) est placée en haut du microscope.

La régulation de la température de l'environnement cellulaire au sein du microscope est essentielle. Pour cela une chambre de thermalisation à été fabriqué au laboratoire et montée sur le microscope maintenant la température à 37°C.

Les objectifs utilisés ont été: 40x à air pour l'acquisition d'image avec la caméra CoolSNAP et 63x à huile avec la CMOS. Un zoom optique de facteur 1,5 à également été utilisé (taille de pixel: 6,7µm).

4.2 Acquisition d'images

Toutes les acquisitions d'images pour la TFM ont été effectuées avec le logiciel micromanager afin d'automatiser l'acquisition d'image en de multiple positions (environ une trentaine de positions par gel sont prises).

Dans une expérience type de TFM, une fois les cellules étalées (une nuit dans notre cas), des images en champ clair des cellules et des images des billes fluorescentes sont prises en premier lieu pour chacune des positions (chaque position correspondant à une cellule). Afin de mesurer le champ de déplacement induit par les forces de traction cellulaires sur le gel, une autre image des billes est prise après avoir détaché les cellules à la trypsine, cette dernière image correspondant à l'état de relaxation du gel.

Il est également possible de faire de la TFM résolue en temps, dite TFM dynamique, c'est à dire lorsque l'on suit l'évolution de la force de traction au cours du temps. Le logiciel IQ a cette fois-ci été programmé afin d'automatiser l'acquisition d'image résolue en temps. Une image en champ clair des cellules, une image des billes et une image dans un autre canal de fluorescence (par exemple l'actine) sont prises pour chaque temps (la fréquence étant définie par l'utilisateur). Et enfin, une dernière images des billes dans leur état relaxé est alors prise.

5. Le traitement d'images

5.1 La microscopie à Traction de Force: aspects expérimentaux

Afin d'explorer les mécanismes régissant le développement des forces créées par des cellules adhérentes, notre équipe a implémentée la méthode de TFM appelée FTTC (*Fourier Transform Traction Cytometry*). Notre technique utilise pour la mesure du déplacement des billes la PIV (*Particle image velocimetry*) et le SPT (*single particle tracking*) dans le but d'obtenir la meilleure précision sur la mesure de force possible. Deux étapes sont cruciales: la mesure du déplacement des billes et le calcul des forces.

5.1.1 Détermination des déplacements

La détermination des déplacements se fait en plusieurs étapes: pour les expériences de FTTC on prend tout d'abord deux images. Une image des billes lorsque la cellule adhère sur le substrat: c'est l'image sous contraintes et une image après avoir détaché la cellule (afin d'avoir la position des billes « au repos »): c'est l'image non stressée.

On effectue alors une correction globale de position relative de ces images afin de s'affranchir des dérives de position dues aux paramètres extérieurs, telle que la dérive de la platine d'observation du microscope (dilatation thermique, erreur de reproductibilité de la platine pour revenir à une position...). Cette première correction se fait en déterminant le maximum d'auto-corrélation entre les deux images.

Ensuite un découpage des images de billes fluorescentes en petites fenêtres régulièrement espacées est effectué pour pouvoir utiliser la technique de PIV (*Particle Imaging Velocimetry*). Puis un calcul de corrélation entre les fenêtres correspondant aux images avec et sans contraintes est effectué (Sabass et al 2008 ; Dembo et Wang, 1999). Le déplacement moyen pour chaque fenêtre est calculé à partir du pic du maximum de l'image auto-corrélée ; on détermine le maximum de corrélation avec une résolution sub-pixel. La taille des fenêtres est un compromis entre résolution spatiale et précision du calcul de corrélation. En effet, plus la fenêtre est grande, meilleur est le calcul de corrélation, mais moins la résolution spatiale est précise. La taille typique de nos fenêtres varie entre 64 et 128 pixels.

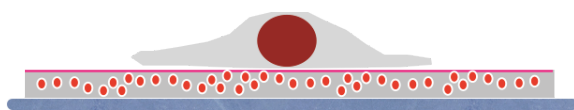
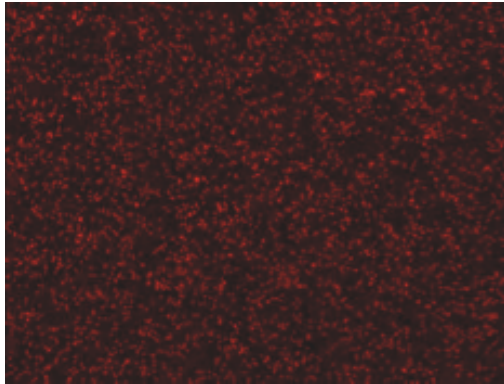
Une fois tous les déplacements calculés par PIV on recalcule les deux imagerie de façon à annuler le déplacement moyen sur la fenêtre. Mais certains déplacements subsistent, induit par les déformations du gel à une échelle spatiale plus petite par les cellules. On effectue alors une analyse plus fine par *single particle tracking* (SPT) pour mesurer les déplacements résiduels, les déplacements restant étant très faibles entre la fenêtre sous contraintes et celle sans contraintes corrigés par PIV (Figure II.5.1.a).

On obtient donc une carte du champ de déplacement de la cellule. De là on peut procéder au calcul de FTTC et remonter au champ de forces exercé par les cellules adhérentes.

5.1.2 Détermination du champ de traction

Comme décrit précédemment la transformée de Fourier (TF) est utilisée afin de résoudre le problème inverse. Dans ce cas la résolution du problème est largement simplifiée puisqu'il s'agit ici d'inverser une matrice diagonale. En effet dans l'espace de Fourier, le produit de la convolution devient un simple produit et

A) image avec contraintes:
la cellule adhère



B) image sans contraintes:
la cellule est détachée

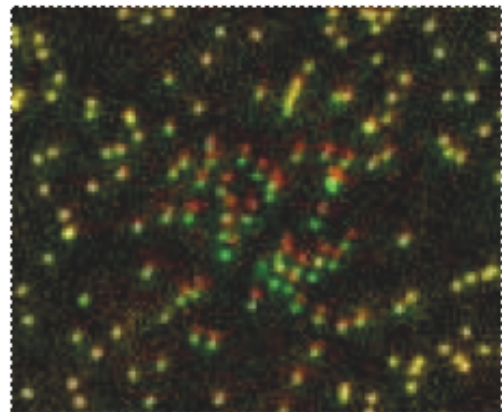
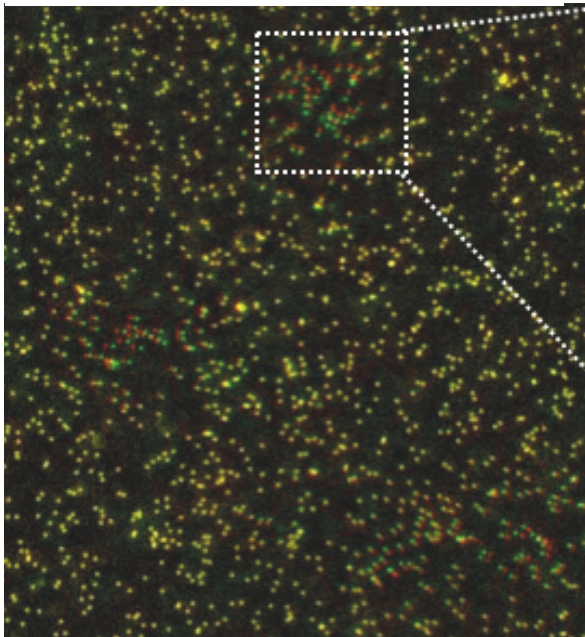
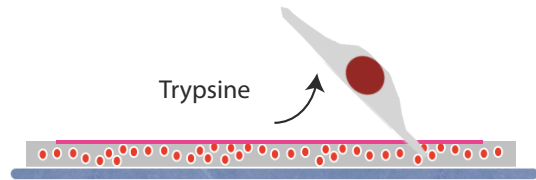
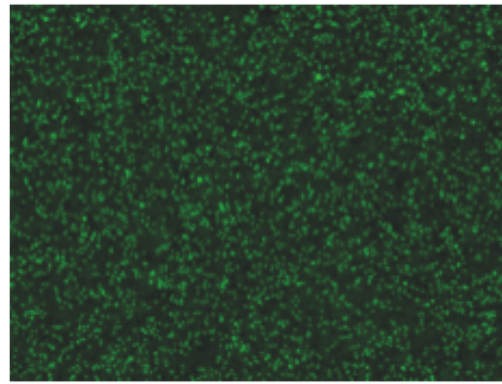


image fusionnée A+B

Figure II.5.1.a Illustration montrant le déplacement des billes qui est calculé selon la méthode décrite dans ce paragraphe afin de déterminer le champ de déplacement.

par conséquent il n'y a pas de couplage de vecteur d'onde.

$$\tilde{u}_i(\mathbf{k}) = \sum_j \check{G}_{ij}(\mathbf{k})^* \check{T}_j(\mathbf{k})$$

où \tilde{u} , \check{G} et \check{T} sont respectivement les transformées de Fourier du déplacement, du tenseur de Green et du champ de traction, \mathbf{k} le vecteur d'onde dans l'espace de Fourier et (i,j) les deux dimensions dans le plan.

Donc la traction est donnée par:

$$\check{T}_i(\mathbf{k}) = \check{G}_{ij}^{-1}(\mathbf{k})^* \tilde{u}_j(\mathbf{k})$$

$$\text{avec } \check{G} = \frac{2(1+\nu)}{Ek^3} \begin{bmatrix} (1-\nu)k^2 + \nu k_y^2 & \nu k_x k_y \\ \nu k_x k_y & (1-\nu)k^2 + \nu k_x^2 \end{bmatrix}$$

Puisque nous avons obtenu le champ de déplacement dans un réseau régulier, cela remplit la condition d'utilisation de la transformée de Fourier rapide (FTT). La transformée de Fourier (TF) du champ de déplacement \tilde{u} est calculée. Il est ensuite facile d'inverser la matrice pour tous les vecteurs d'onde \mathbf{k} , celle-ci étant diagonale dans l'espace de Fourier. La transformée de Fourier du champ de force est alors calculée par simple multiplication entre la TF du déplacement et l'inverse de la fonction de Boussinesq-Green. Cependant, des bruits résiduels subsistent dus au mauvais conditionnement (Schwartz et al, 2002), un terme de régularisation (Sabass et al, 2008) est alors introduit.

Une fois le calcul fini, la carte de force de traction est réalisée dans l'espace réel en inversant la FTT. Ci-dessous un exemple de calcul classique de force de traction de cellules MEF cultivées sur un gel de PAA en utilisant la technique décrite précédemment (Figure II.5.1.b).

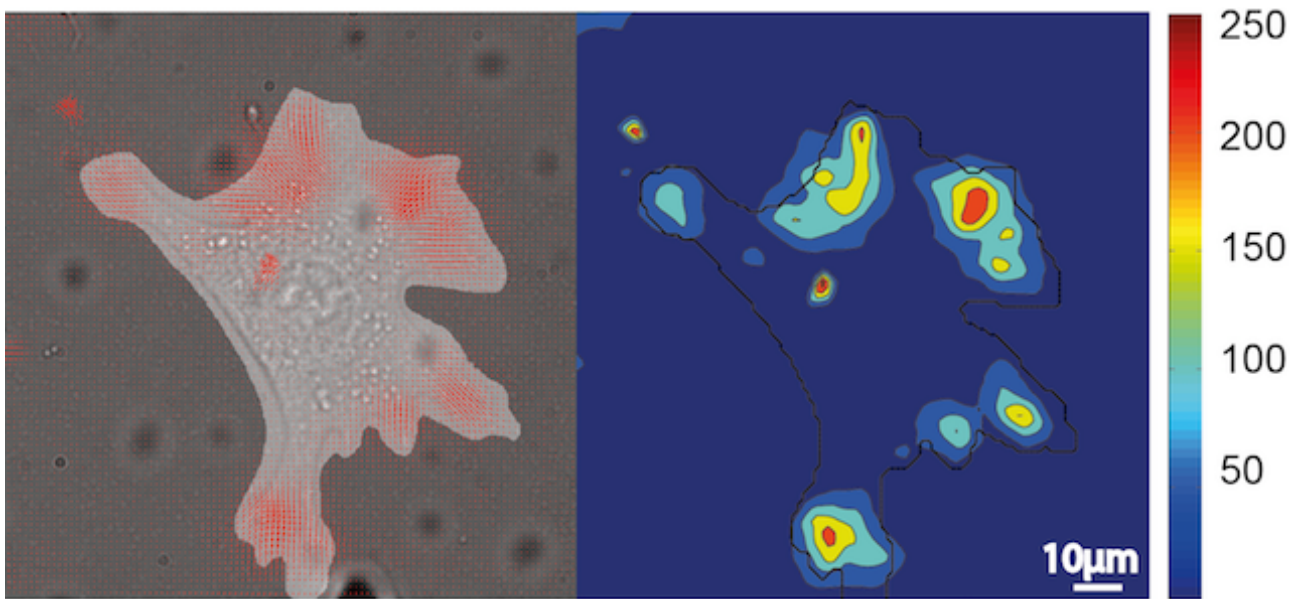


Figure II.5.1.b Exemple d'un calcul par FTTC du champ de contraintes exercé par une cellule unique adhérent sur un hydrogel de polyacrylamide. L'image de gauche correspond à la superposition de l'image en champ clair d'une cellule adhérente et du champ de forces associé (flèches rouges) et l'image de droite correspond au champ de pression au niveau du contact cellule/substrat (barre de pression en Pascal).

Mesure de la force intercellulaire

La microscopie de traction de force permet également d'accéder aux forces intercellulaires grâce à la méthode décrite par le groupe de Gardel (Maruthamuthu et al, 2011). La TFM ne nous donnant accès directement qu'aux forces cellule/substrat, cette méthode se base sur la mesure du déséquilibre des forces dans un système à deux cellules pour en tirer la force cellule/cellule.

En effet, nous savons que pour des cellules isolées, les contraintes exercées sur la matrice extracellulaire sont en équilibre mécanique sur l'ensemble de la cellule car l'accélération de la cellule est très faible, la somme vectorielle des forces de traction à travers la cellule $\sum \mathbf{T}_i$ doit être égale à zéro pour une cellule isolée ou pour un îlot de deux cellules ou plus. Cependant, cette quantité n'est pas

strictement nulle en pratique, les erreurs (mesurées par $|\Sigma \mathbf{T}_i| / \Sigma |\mathbf{T}_i|$) étant d'environ 5% (où \mathbf{T}_i est le vecteur force de traction).

Lorsque l'on calcule les forces sur une cellule dans un doublet, on remarque un déséquilibre qui reflèterait la force exercée par le contact cellule/cellule. Ainsi, la force exercée par l'une des cellules sur l'autre est donnée par $\mathbf{F}_{\text{cell1}} = \Sigma_{\text{cell1}} \mathbf{T}_i$ et inversement. Elles sont en théorie, égales et opposées et la moyenne $\mathbf{F}_{\text{cell-cell}}$ pour une paire de cellule est alors calculée comme : $(\mathbf{F}_{\text{cell1}} - \mathbf{F}_{\text{cell2}})/2$. Cette force serait comprise entre la dizaine de nN et 100nN, elle serait équivalente à la moitié de celle exercée par la cellule sur une paire (Figure II.5.1.c).

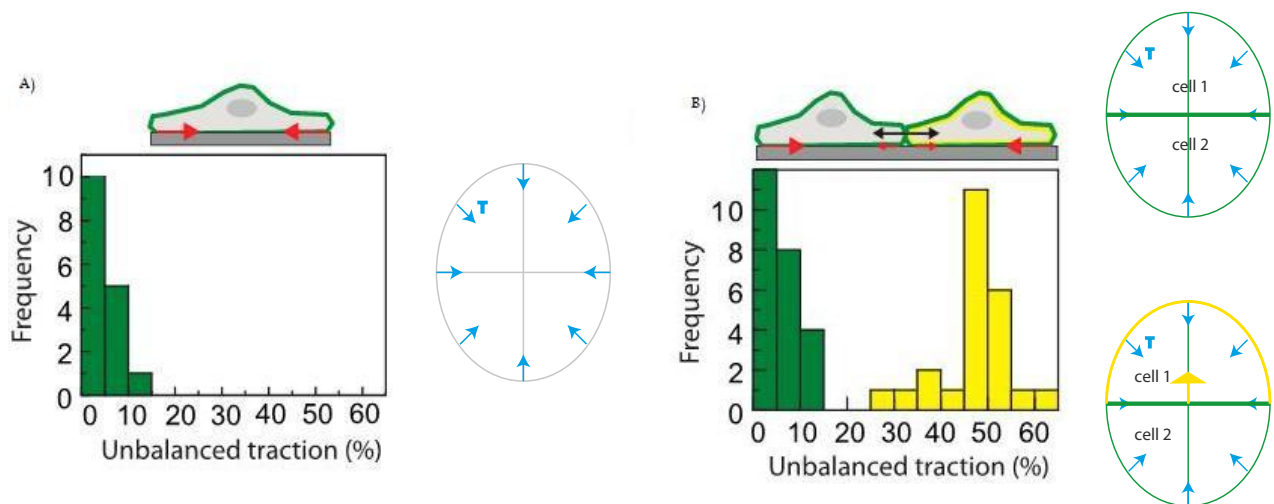


Figure II.5.1.c Forces exercées au contact cadhérine-dépendant cellule/cellule. A) Les forces de traction sont en équilibre pour une cellule isolée. B) Les forces de traction internes sont en équilibre sur une paire de cellule mais pas sur une cellule individuelle appartenant à un doublet (adapté de Maruthamuthu et al, 2011)

La TFM donne accès au champ de contraintes exercé par les cellules d'où l'on peut tirer différentes grandeurs mécaniques nous permettant de mieux

comprendre l'interaction cellule/substrat: l'énergie contractile et le moment contractile (Butler et al, 2002).

5.1.2.1 Contraction/dilatation: le moment contractile

On calcule un tenseur qui correspond au moment d'ordre un qui est associé aux tractions de contraction/dilatation (tractions orientées radialement) et aux tractions associées aux couples (tractions orientées circonférentiellement) (Figure II.5.1.d).

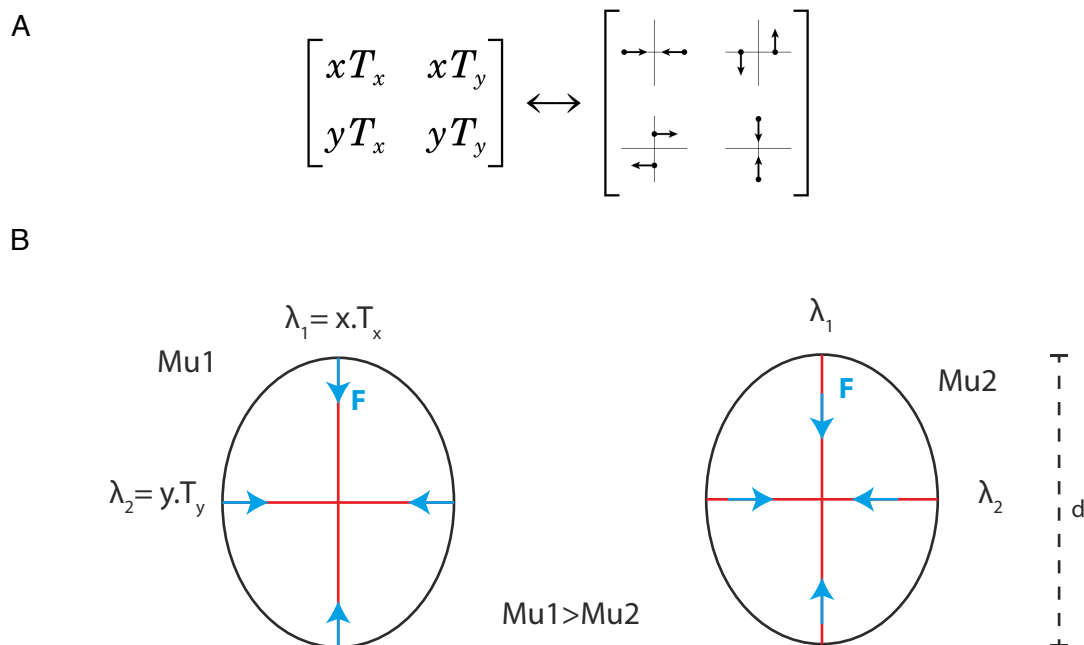


Figure II.5.1.d Le moment contractile: une mesure de la distribution spatiale des forces de traction. A) Aide visuelle des 4 combinaisons de traction. B) Schéma après diagonalisation. Lorsque la distance (d) entre les points d'application des forces (F) augmente, le moment contractile tend à augmenter (à force et surface d'adhérence constante).

Elles correspondent aux quatre combinaisons de traction dans les directions x et y pondérées par leur coordonnées x et y . Comme le couple net est nul sur une

cellule, on peut trouver théoriquement un système d'axe où le tenseur est diagonal. Lorsque l'on diagonalise cette matrice selon les axes principaux de contractions, on obtient deux vecteurs propres associés à leur deux valeurs propres λ_1 et λ_2 .

Le moment (M_u) qui tend à dilater ou contracter le substrat est donné par la trace de cette matrice:

$$M_u = \lambda_1 + \lambda_2$$

Le moment contractile correspond donc au produit scalaire entre la force totale exercée par la cellule et la distance entre l'origine O du repère (pour nous le centroïde de la cellule) et le point M où s'applique la force.

5.1.2.2 L'énergie contractile

L'énergie contractile (E_c) correspond à l'énergie totale transférée de la cellule au substrat. Elle est donnée par le produit scalaire entre la contrainte locale et le déplacement, le tout intégré sur la surface de la cellule:

$$E_c = 1/2 \int \mathbf{T}(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{u}(\mathbf{r}) dx dy$$

Le déplacement $\mathbf{u}(\mathbf{r})$ correspond à la distance séparant la bille stressée et non stressée: $\mathbf{u}(\mathbf{r}) = \mathbf{r}^0 - \mathbf{r}^s$.

Finalement, l'utilisation combinée des techniques de PIV et SPT résulte en une très grande précision de calcul dans la détermination des champs de déplacement (40nm de résolution spatiale). Après avoir décrit la méthode de quantification des forces de traction, nous allons voir comment analyser les structures biologiques par lesquelles les cellules développent ces forces contractiles.

5.2 Les structures biologiques: analyse quantitative des immunomarquages

La technique de marquage par immunofluorescence est classiquement utilisée en biologie cellulaire afin d'observer les différentes structures composant les cellules permettant une meilleure compréhension de leur architecture (Figure II.5.2.a). Seulement la quantification de ces structures est un problème majeur dans l'élucidations des questions biologiques. Dans la suite de ce paragraphe, différents programmes, mis au point au laboratoire, sont décrit afin de palier à ce problème et d'accéder à une lecture plus claire des images de marquages des cellules en y apportant des quantifications.

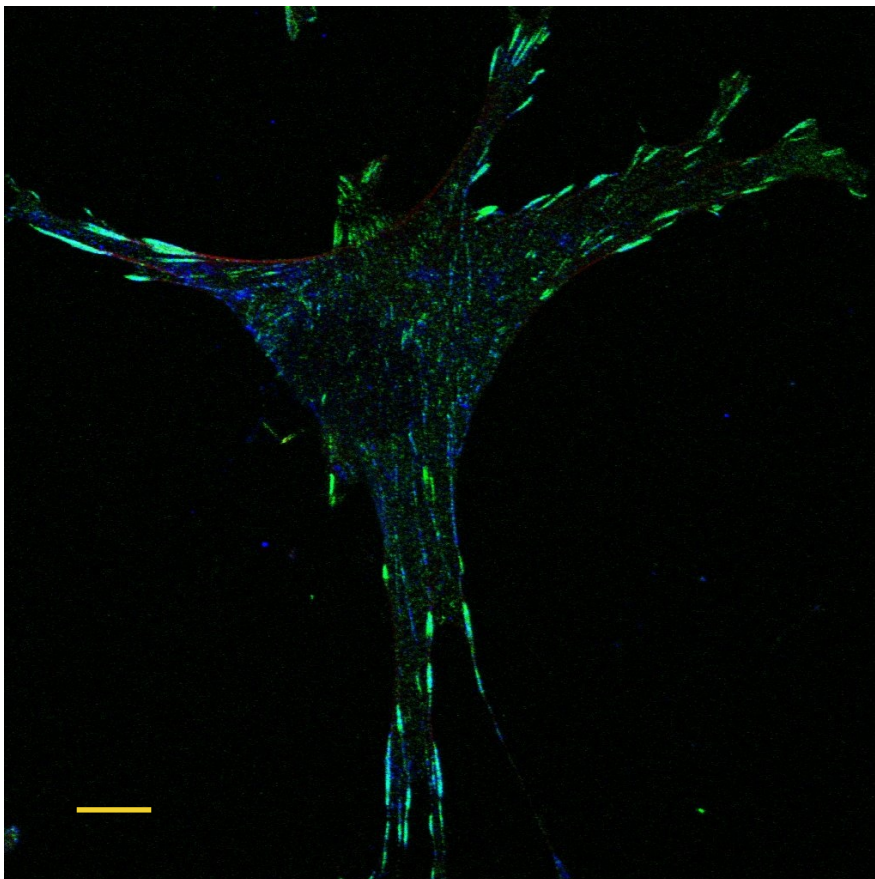


Figure II.5.2.a Cytosquelette d'actine $\beta 3$ -GFP (Bleu) des cellules MEF WT et marquage des sites adhésifs contenant de la vinculine (vert). Bar d'échelle: $18\mu\text{m}$.

Pour l'analyse des cellules marquées par immunofluorescence, les cellules ont été montées sur des lames de microscope dans des solutions de Mowiol⁸ et imagées au microscope confocal. Nous avons analysé puis quantifié les adhésions focales formées par les cellules en utilisant des programmes MATLAB (The MathWorks) développés au sein de l'équipe. Trois différents programmes ont été mis au point.

5.2.1. Analyse de l'intensité de fluorescences et de l'aire des adhésions focales

Le premier programme nous donne accès à l'intensité totale de fluorescence ainsi qu'à l'aire de chaque structure adhésive par cellule. Pour accéder à ces grandeurs il faut tout d'abord normaliser l'intensité de la cellule. Dans le cas d'un signal endogène (immunofluorescence) nous devons normaliser en soustrayant le bruit de fond afin de garder la dynamique de la cellule sans affecter l'information contenu à l'intérieur de celle-ci. Dans ce cas, l'intensité correspond à la quantité de matière dans la région analysée contrairement au cas d'un signal exogène (d'une transfection) où la protéine est sur-exprimé. Ensuite afin de pouvoir détecter les différentes plaques, on impose un seuil de détection et on obtient une image, binaire. Cette dernière montrant les adhésions focales nous permet de mesurer: l'aire totale des adhésions focales par cellules et pour chaque adhésion focale, l'intensité totale de fluorescence dans cette aire.

5.2.2 Quantification de la distribution spatiale des adhésions

Le deuxième programme quant à lui nous donne accès à la distribution spatiale (distance par rapport à la membrane) de l'intensité de ces adhésions

⁸ Le Mowiol est une solution de montage qui polymérise au contact de l'air.



Figure II.5.2.b Capture d'écran montrant la détection des plaques au sein d'une cellule. A gauche, mesure de l'intensité de chaque plaque, à droite calcul de la distance entre la plaque et la membrane grâce à une image binaire.

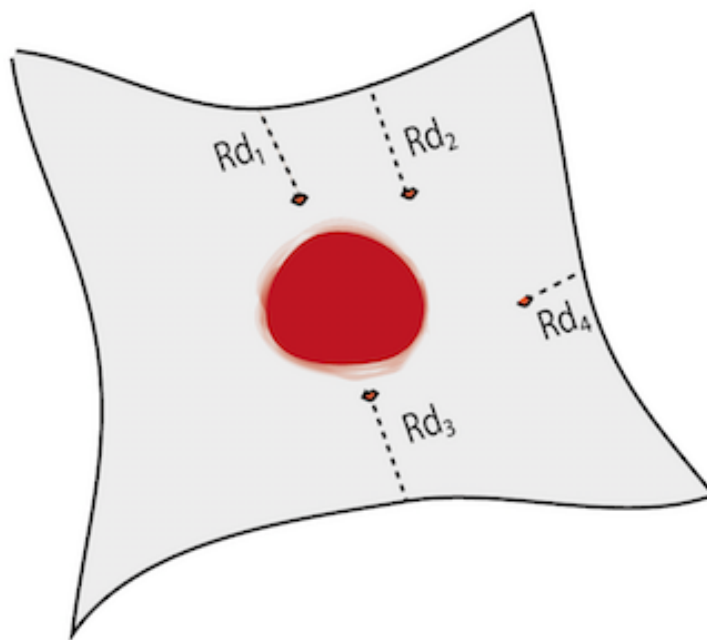


Figure II.5.2.c Schéma illustrant le calcul de distribution spatiale des adhésions en déterminant la distance relative à la membrane (Rd) de chaque sites d'adhésions (n).

focales en se basant sur le programme précédent et en y ajoutant une quantification de chaque adhésion. La détermination de la position de la membrane se fait grâce à une image binaire correspondant au contour de la cellule (Figure II.5.2.b). Dans l'étape de calcul de la distribution d'intensité de fluorescence de chaque adhésion focale pour chaque cellule, nous calculons la distance entre le centroïde de chaque objet et chaque pixel de la membrane. Puis nous sauvons la distance minimale calculée.

Dans notre analyse, nous utilisons l'intensité moyenne de chaque objet plutôt que l'intensité totale afin d'éviter la dépendance en taille de l'objet (Figure II.5.2.c). Ainsi nous pouvons obtenir un graphique nous donnant accès à l'intensité de fluorescence des adhésions en fonction de leur position spatiale relative à la membrane.

5.2.3 Analyse quantitative du ratio de colocalisation des adhésions focales

Le troisième programme nous permet de calculer les ratios de colocalisation de chaque site adhésif pour deux marquages différents. Pour cela la même procédure que dans le premier programme est reprise pour calculer l'intensité de fluorescence des adhésions. Mais au moment de la détection des plaques seule l'image binaire du premier marquage qui est créée sera utilisée et servira de masque pour la deuxième image de l'autre marquage. En effet, lors du traitement de la deuxième image, le masque créé précédemment est superposé à cette deuxième afin de procéder au calcul du ratio d'intensité de fluorescence entre les deux images pour chaque plaque détectée à travers ce masque (Figure II.5.2.d). Nous obtenons ainsi le ratio de colocalisation pour une cellule (Figure II.5.2.e).

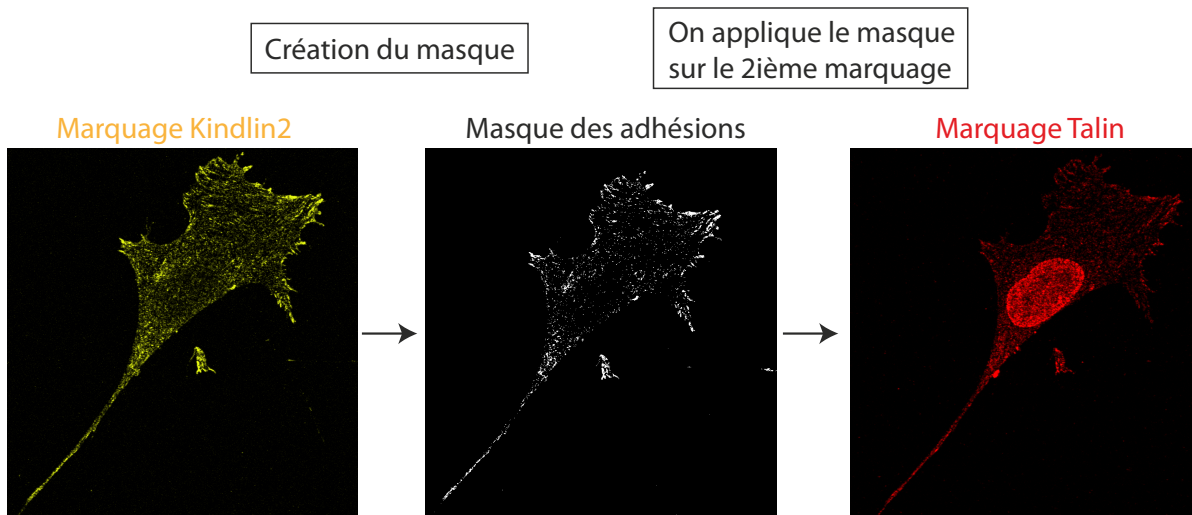


Figure II.5.2.d Illustration du logiciel de quantification du ratio de colocalisation des adhésions. De gauche à droite: à partir du premier marquage on crée un masque des adhésions que l'on applique sur le second marquage afin de prendre en compte les mêmes plaques d'adhésion pour réaliser le ratio de colocalisation au sein de chacune de ces adhésions.

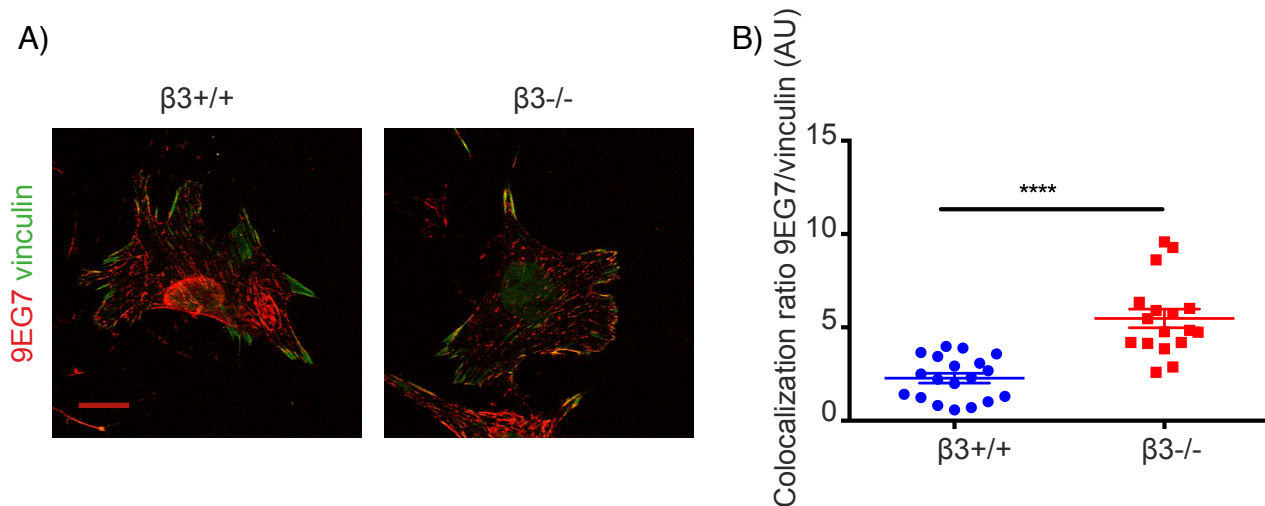


Figure II.5.2.e Quantification du ratio de colocalisation intégrine $\beta 1$ activées/ vinculine. A) Double marquage des intégrines $\beta 1$ (9EG7 en rouge) et de la vinculine (en vert) dans les MEF $\beta 3^{+/+}$ et $\beta 3^{-/-}$. B) Quantification du ratio de colocalisation de ces deux molécules pour deux phénotypes différents. Bar d'échelle: $27\mu m$.

Les chapitres suivants montrent l'utilisation de ces différentes techniques (TFM, distribution spatiale des adhésions, ratio de colocalisation) dans le but de quantifier les forces exercées par les cellules sur des substrats homogènes (hydrogels de 5kPa ou verre) afin de répondre à des questions fondamentales de biophysique.

Chapitre III. L'intégrine $\beta 3$, un régulateur spatio-temporel de la génération des forces de traction via son interaction avec l'intégrine $\beta 1$

Introduction

La capacité des cellules à sentir les propriétés physiques de leur environnement est un facteur déterminant de l'homéostasie tissulaire. L'un des aspects les plus remarquable des tissus est leur aptitude à maintenir une intégrité mécanique alors qu'ils sont soumis à des contraintes extérieures. Les cellules perçoivent et répondent à ces contraintes en développant des structures d'adhérences appelées adhésions focales. Ces adhésions focales sont composés entre autres de protéines transmembranaires, les intégrines, qui font le lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire en recrutant divers adaptateurs moléculaires.

Des études précédentes ont montré que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ sont principalement responsables de la mécano-sensation cellulaire, mais le couplage éventuel entre ces intégrines reste à être élucidé.

De nombreuses études font ressortir l'importance de l'intégrine $\beta 1$ dans la génération de forces. En effet, les cellules exprimant une grande quantité d'intégrines $\alpha 5\beta 1$ ont tendance à être plus invasives et à générer des forces plus importantes comparées aux cellules exprimant un niveau faible d'intégrines $\alpha 5\beta 1$ (Mierke et al, 2011). Le recrutement spécifique des intégrines $\beta 1$ sur des micro-piliers sélectifs (Rahmouni et al, 2013) et l'activation chimique des intégrines $\beta 1$ (Lin et al, 2013) sont tous deux associés à un développement de forces élevées. De plus, une expérience utilisant des billes magnétiques fonctionnalisées et attachées sur la surface dorsale des cellules, a montré que l'activation spécifique des intégrines $\beta 1$ est nécessaire pour être capable de résister aux contraintes fortes appliquées par les pinces magnétiques (Roca-Cusach et al, 2009).

Tandis que l'intégrine $\beta 1$ est très largement associée à la génération des forces de traction à l'interface cellule/substrat, l'intégrine $\beta 3$ quant à elle se verrait attribuer plutôt un rôle de mécano-senseur capable de convertir le signal mécanique en un signal biochimique. Ainsi l'intégrine $\beta 3$ serait central dans le

processus de mécanotransduction (Roca-Cusach et al, 2009). Par ailleurs, la caractérisation des adhésomes spécifiques des intégrines $\beta 1$ et αv ont montré que l'intégrine $\beta 3$ promeut la polymérisation de l'actine non ramifiée tandis que l'intégrine $\beta 1$ induit une contractilité myosine-II dépendante et contribuent de façon synergique à la détection de la rigidité (Schiller et al, 2013). De plus les intégrines $\beta 3$ semblent agir localement pour supprimer l'activation des intégrines $\beta 1$ et doit contribuer à la régulation de la dynamique de l'actine à la périphérie de la cellule à travers le chemin VASP/RIAM (Worth et al, 2011). Par ailleurs la différence considérable dans la nano-organisation et la dynamique des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ au sein des adhésions focales (due à leur partie cytoplasmique) fournit un argument supplémentaire quant à la spécificité et à la complémentarité de ces deux intégrines (Rossier et al, 2012). Alors que l'intégrine $\beta 3$ est stationnaire et abondante dans les adhésions focales, une proportion significative d'intégrines $\beta 1$ immobiles affiche une translocation rétrograde semblable à celle de l'actine-F. Cette coopération permet ainsi à la cellule de sentir la rigidité de son environnement et de s'adapter en conséquence.

Globalement, ces données confirment l'idée qu'au sein des adhésions focales, les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ affichent des propriétés biochimiques distinctes pour réguler la génération de forces.

Le but principal de cette thèse est de comprendre comment les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ alors qu'elles lient le même ligand extracellulaire, sont impliquées dans la génération de forces et quels sont leurs rôles respectifs dans la transduction des réponses cellulaires. Pour cela, les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ doivent jouer des rôles mécaniques spécifiques et être associées à différentes voies de signalisation. Nous chercherons donc à identifier leur mécanismes d'action et leur rôle dans la génération de forces de traction cellulaires.

Afin de quantifier les propriétés des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la génération et la modulation des forces appliquées au substrat, la microscopie à traction de force (TFM) a été utilisée pour déterminer les forces de traction générées par des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) génétiquement modifiées. Un hydrogel de polyacrylamide (PAA) a été utilisé comme substrat, celui-ci étant un matériau élastique mimant au mieux les propriétés mécaniques et physiologiques perçues par les fibroblastes *in vivo* (Paszek et al, 2005, Engler et al, 2006 ; Wells et al, 2008 ; Lopez et al, 2008). Dans le but de comparer les propriétés des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ du point de vue des forces de traction cellulaires, les hydrogels de PAA ont été fonctionnalisés avec de la fibronectine, celle-ci étant une protéine de la MEC reconnue par les deux intégrines. Afin de permettre une comparaison entre des cellules génétiquement différentes, toutes les expériences ont été faites avec des hydrogels de rigidité et de densité en fibronectine identiques, nous évitant ainsi des biais provenant des propriétés physiques et chimiques des substrats (Trappmann et al, 2012).

Résultats

1. L'intégrine $\beta 1$ est un effecteur essentiel des forces de traction cellulaires

Pour déterminer le rôle de l'intégrine $\beta 1$ dans la capacité des cellules à transmettre des forces à un substrat, des MEFs génétiquement appauvries en intégrine $\beta 1$ ont été analysées par TFM. Cette technique nous donne accès au champ de contraintes exercé par les cellules, d'où l'on peut tirer différentes grandeurs. Nous nous focaliserons sur deux d'entre elles: l'énergie contractile (E_c) qui représente l'énergie totale transférée par la cellule au substrat élastique, correspondant au produit scalaire de la contrainte locale par le déplacement, le tout intégré sur la surface totale de la cellule et le moment contractile faisant le lien entre les forces et leur distribution spatiale, donné par le produit scalaire en chaque point du vecteur position et de la contrainte, intégré sur la cellule (Figure III.1.1 et Chap.II.5).

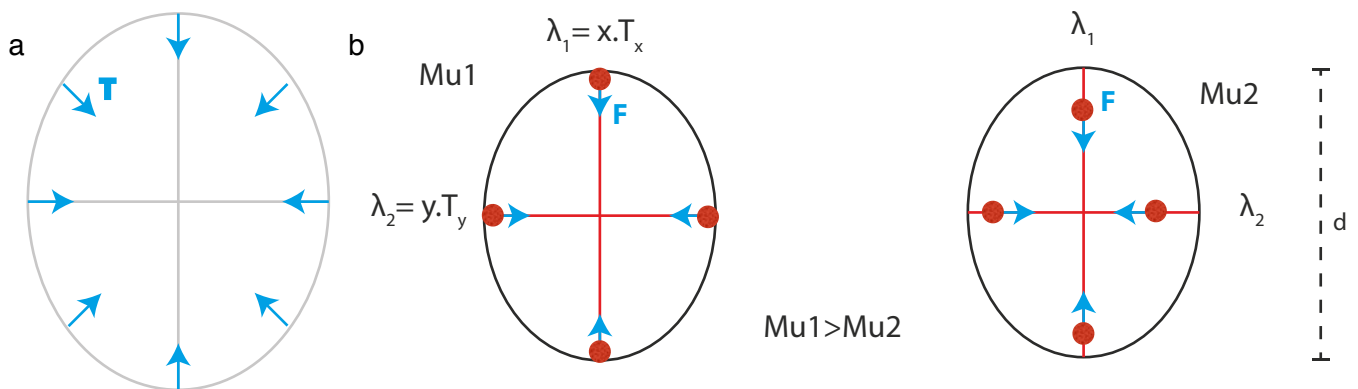


Figure III.1.1 Représentation schématique des paramètres mécaniques utilisés pour quantifier les forces de traction. L'énergie contractile correspond à l'énergie transférée de la cellule au substrat (a), tandis que la variation du moment contractile est liée à un changement dans la distribution spatiale des forces de traction (b).

Afin de générer une population homogène de MEFs déficientes en intégrine $\beta 1$, des cellules MEFs primaires dérivées d'embryons de souris d'intégrine $\beta 1^{\text{LoxP/LoxP}}$ traitées ou non avec de la CRE recombinase, ont été triées par FACS selon leur expression en intégrines $\beta 1$ de surface (Fässler et al, 1995). Puis chacun des géotypes cellulaires est déposé séparément sur un gel de PAA de même rigidité et de même concentration en fibronectine afin de procéder aux mesures de TFM.

1.1 L'intégrine $\beta 1$ est principalement responsable de la génération de forces cellulaires

Bien que toutes les cellules appauvries ou non en $\beta 1$ soient toujours attachées et étalées sur le substrat (Figure III.1.2), on remarque qu'elles n'exercent pas la même quantité de forces. En effet, les mesures par TFM nous révèlent que l'énergie contractile générée par les cellules sont cent fois plus faibles en l'absence de l'intégrine $\beta 1$ (Figure III.1.3) en dépit de la présence des intégrines $\beta 3$. De plus l'expression des intégrines $\beta 1$ fusionnées à une protéine GFP dans les MEFs déficientes en $\beta 1$ rétablissent le phénotype sauvage (WT), nous confirment que l'intégrine $\beta 1$ est impliquée dans la génération de forces cellulaires (Figure III.1.3).

L'importance de l'intégrine $\beta 1$ dans la génération de forces a déjà été suggérée dans des études antérieures utilisant l'analyse par flux optique (PIV) où la fonction des intégrines $\beta 1$ avait été perturbée au moyen d'un anticorps bloquant (Poincloux et al, 2011) ou par analyse TFM après sur-expression des $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules MDA-MB-231 (Mierke et al, 2011).

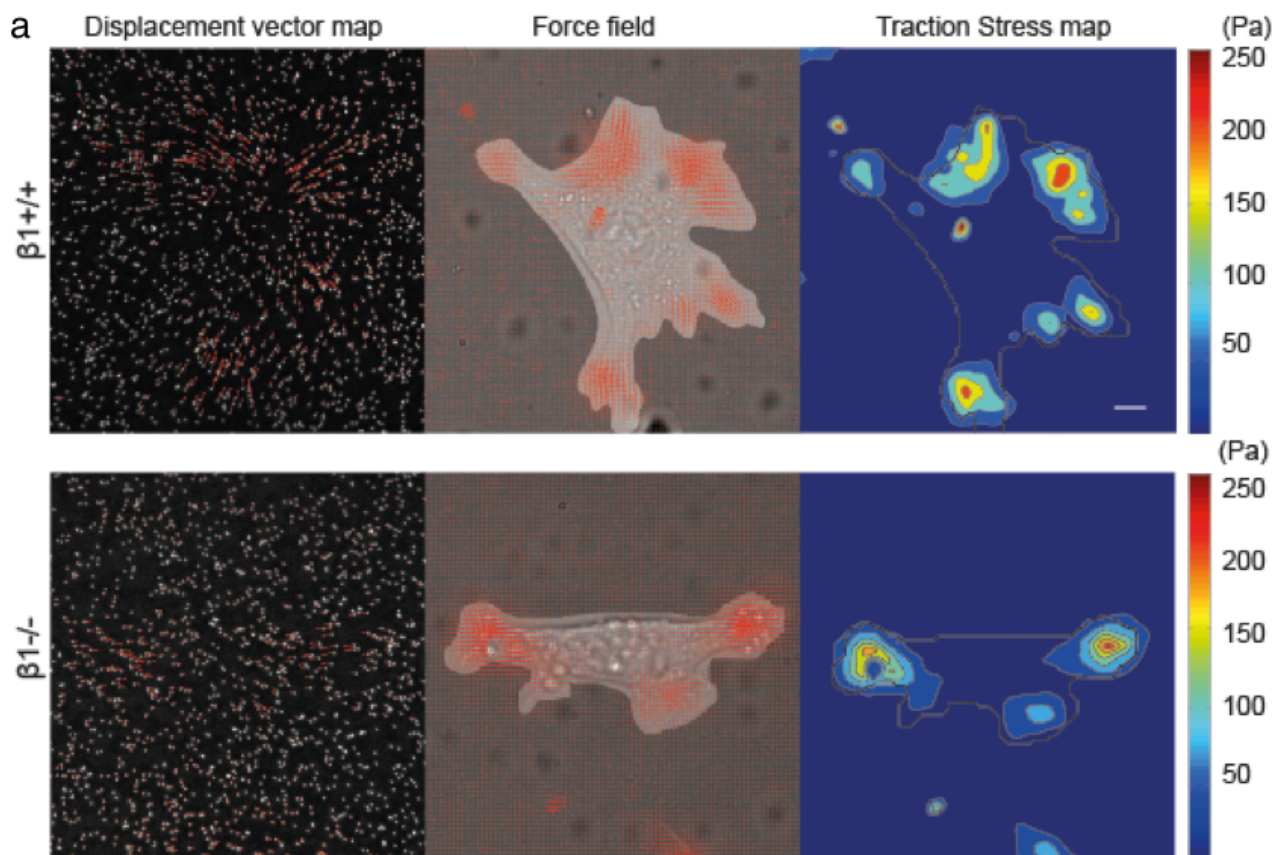


Figure III.1.2 a) Carte du champ de forces (flèches rouges) et des forces de traction exercées sur le gel de PAA pour des cellules non modifiées ($\beta 1^{+/+}$) ou déficientes en $\beta 1$ ($\beta 1^{-/-}$). La technique de TFM est basée sur la mesure du déplacement des billes contenues dans l'hydrogel de PAA. $n > 18$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). Bar d'échelle = $10\mu m$.

Par conséquent, la diminution de l'énergie contractile induite par la perte des intégrines $\beta 1$ observée dans nos résultats doit résulter de deux mécanismes principaux: d'une part de la capacité de l'intégrine $\beta 1$ à recruter les éléments moléculaires importants pour la génération des forces de traction et d'autre part de la capacité de résistance dépendante des intégrines $\beta 1$. Les résultats obtenus via notre approche génétique peuvent être expliqués par les deux

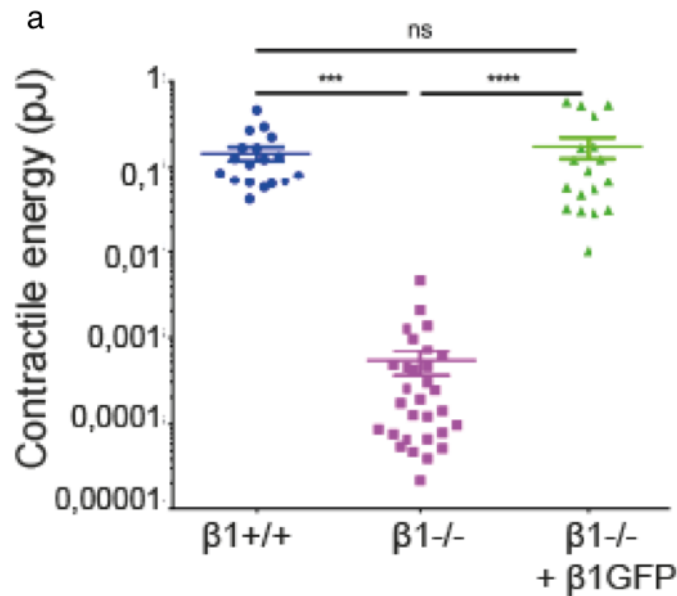


Figure III.1.3 On observe que les cellules déficientes en intégrines $\beta 1$ adhérant au gel de PAA de 5kPa fonctionnalisé avec de la fibronectine exercent moins de forces de traction que les WT. Sur des gels de 5kPa fonctionnalisés avec de la fibronectine, les cellules déficientes en $\beta 1$ intégrines montrent une chute significative de l'énergie contractile. $n > 18$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

scénarios. D'une part, des études récentes utilisant des micro-piliers fonctionnalisés avec un composé imitant un peptide biologiquement actif sélectionnant les intégrines, ont démontré que l'activation des voies dépendantes des intégrines $\beta 1$ mène à la génération de forces bien plus élevées que lorsque les intégrines $\beta 3$ sont activées (Rahmouni et al., 2013), l'activation des intégrines $\beta 1$ conduit également à une hausse des forces de traction appliquées à des substrats fait de micro-piliers en PDMS (Lin et al., 2013).

D'autre part, l'activation des intégrines $\beta 1$ peut aussi réguler spécifiquement la force d'adhérence/ la capacité de résistance. En effet, une études (Roca-Cusach et al, 2009) utilisant des billes magnétiques fonctionnalisées avec des protéines spécifiques de la MEC pour sonder la force d'adhérence des regroupement

d'intégrines à la surface des cellules a montré que contrairement aux intégrines $\beta 3$, les intégrines $\beta 1$ apparaissent comme essentielles afin de résister aux forces générées par les billes magnétiques.

Par conséquent, il apparaît qu'une augmentation des forces de traction et des forces d'adhérences appliquées au substrat peuvent appuyer le rôle essentiel des intégrines $\beta 1$ dans la régulation de la génération de forces.

Bien que la quantification de l'énergie contractile soit très utile pour accéder à la lecture de la génération de forces cellulaires, elle ne nous fournit aucune information sur la distribution spatiale de ces forces. C'est pourquoi le moment contractile est lui aussi analysé.

1.2 Effet de la perte des intégrines $\beta 1$ sur le moment contractile

Afin d'évaluer la distribution spatiale des forces, nous avons calculé un autre paramètre mécanique auquel la TFM nous donne accès: le moment contractile. Celui-ci nous permettant d'explorer le lien entre les forces de traction et leur distribution spatiale sur la surface de la cellule. Le moment contractile apparaît donc comme une quantité qui met en évidence l'effet de la morphologie cellulaire sur le développement des forces. On observe qu'en l'absence de l'intégrine $\beta 1$, la chute de l'énergie contractile est associée à un changement drastique du moment contractile, signe d'une redistribution des forces restantes et/ou d'une diminution de l'aire d'étalement de la cellule (Figure III.1.4).

Nos résultats montrent que les MEFs déficientes en intégrines $\beta 1$ mènent à une large diminution du moment contractile approchant 0 (Figure III.1b). Derrière cette valeur absolue, la variation du moment contractile nous indique une modulation de la distribution spatiale des forces. En effet, la baisse de forces ($\times 25$) et de

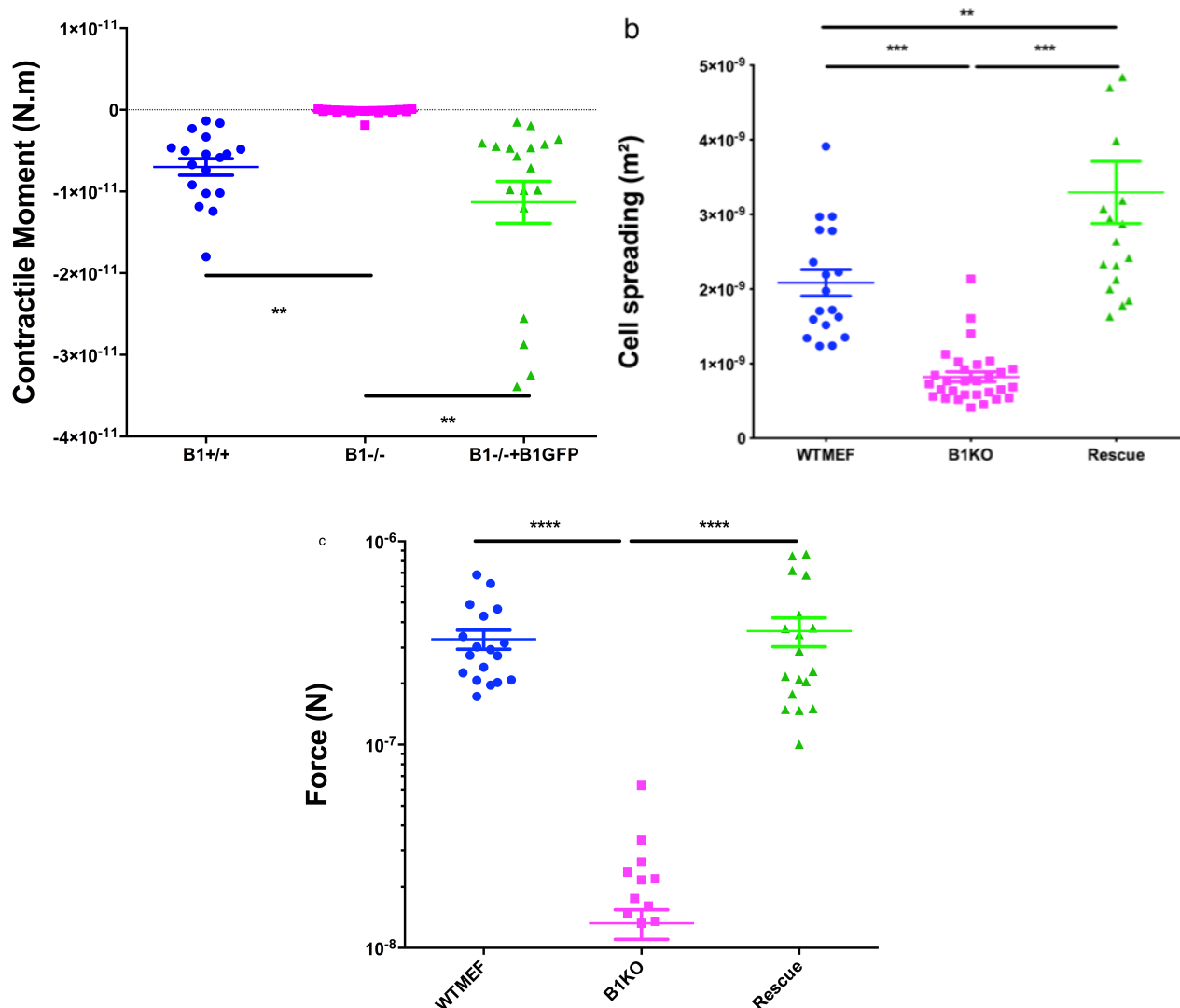


Figure III.1.4 On observe que les cellules déficientes en intégrines $\beta 1$ adhérant au gel de PAA de 5kPa fonctionnalisé avec de la fibronectine exercent moins de forces de traction que les WT. Sur des gels de 5kPa fonctionnalisés avec de la fibronectine, les cellules déficientes en $\beta 1$ intégrines montrent une chute significative du moment contractile (a), de l'aire d'étalement (b) et de la force totale (c). $n > 18$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

surface d'étalement ($\times 2,5$) ne suffisent pas totalement à expliquer la chute du moment contractile ($\times 50$), par conséquent une redistribution des forces a lieu au sein de la cellule. Finalement, en parallèle de la mesure de l'énergie contractile, l'analyse du moment contractile nous révèle que l'intégrine $\beta 1$ est aussi importante pour la régulation de la distribution spatiale de ces forces.

L'effet de l'intégrine $\beta 1$ à la fois sur la génération des forces de traction et sur la répartition des forces corroborent des études précédentes montrant que l'intégrine $\beta 1$ augmente les forces de traction à l'avant de la cellule de façon plus significative que l'intégrine αv (Schiller et al, 2013) ou encore que l'activation des intégrines $\beta 1$ en supprimant son inhibiteur induit une redistribution des forces de traction vers le centre de la cellule (Faurobert et al, 2013). De plus il a été montré que dans les zones centrales des cellules, les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ prédominent (Zamir et al, 2000) et que les cellules favorisant l'adhérence via les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ migrent moins vite (Danen et al, 2005 ; White et al, 2007), fournissant un argument supplémentaires quand au rôle des intégrines $\beta 1$ dans la génération de forces.

2. L'intégrine $\beta 3$ régule négativement les forces de traction cellulaires

L'intégrine $\beta 3$, majoritairement présente dans les adhésions focales (Zamir et al, 2000) a été identifiée comme ayant un rôle important dans l'étalement des cellules (von Wichert et al, 2003) mais également dans la sensibilité des cellules aux forces mécaniques (Goldschmidt et al, 2000). Et bien que l'intégrine $\beta 1$ ait un rôle crucial dans la génération de forces, on ne peut pas exclure le couplage entre les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la régulation de la morphologie cellulaire et la

génération de forces tel que décrit dans de récentes études (Schiller et al, 2013). C'est pourquoi dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressé à la question du rôle de l'intégrine $\beta 3$ dans les propriétés contractiles des MEFs.

2.1 La perte de l'intégrine $\beta 3$ induit une augmentation des forces de traction

Afin de déterminer le rôle des intégrines $\beta 3$ dans les forces de traction cellulaires, nous avons procédé de la même manière que pour l'intégrine $\beta 1$, c'est à dire en quantifiant l'énergie et le moment contractile de la cellule en présence ou non de l'intégrine $\beta 3$ par TFM. Contrairement à ce que nous avons observé pour les cellules déficientes en intégrines $\beta 1$, déclenchant une chute dans

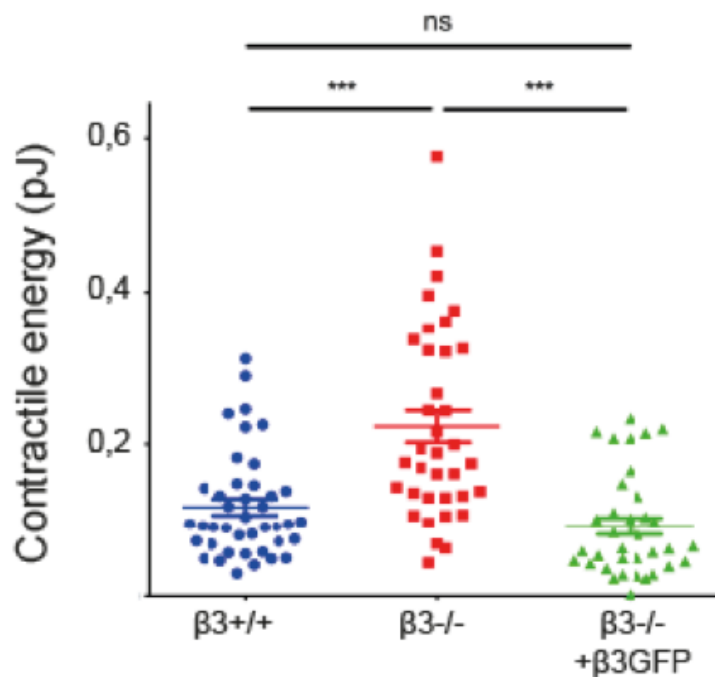


Figure III.2.1 Sur des gels de 5kPa fonctionnalisés avec de la fibronectine, la perte des intégrines $\beta 3$ induit une augmentation de l'énergie contractile. $n > 35$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$, ns: non significatif).

l'énergie transférée au substrat, la perte de l'intégrine $\beta 3$ quant à elle induit une nette augmentation de celle-ci (Figure III.2.1), lui suggérant ainsi une fonction de régulateur négatif de l'énergie contractile. La capacité à réguler négativement l'énergie contractile est donc spécifique à l'intégrine $\beta 3$ puisque la réexpression des intégrines $\beta 3$ fusionnées à une GFP dans les souris sont capables de restaurer complètement le phénotype sauvage (Figure III.2.1).

2.2 La perte de l'intégrine $\beta 3$ n'affecte pas le moment contractile

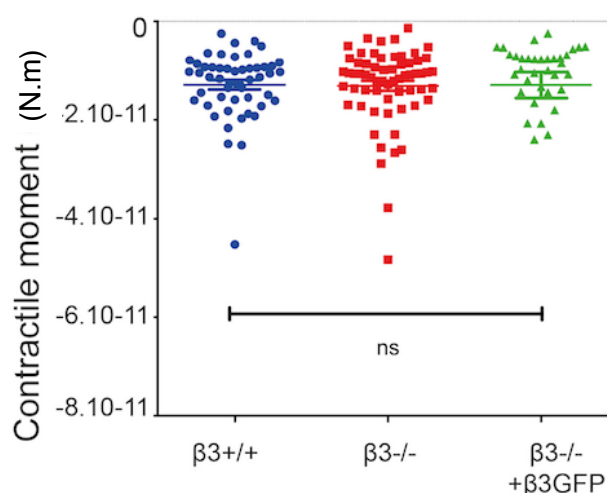


Figure III.2.2 La délétion des intégrines $\beta 3$ induit une augmentation des forces de traction sans affecter le moment contractile. $n > 35$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, ns: non significatif).

De plus et contrairement aux résultats obtenus avec les cellules déficientes en intégrines $\beta 1$, aucune modulation du moment contractile n'est observée en l'absence des intégrines $\beta 3$ (Figure III.2.2). En effet, l'augmentation significative de l'énergie contractile sans modulation du moment contractile est contre intuitive

puisque l'on s'attendrait à une augmentation (de la valeur absolue) de celui-ci et peut être signe d'un processus de compensation actif à travers lequel les cellules adaptent leur morphologie afin de maintenir un moment contractile stable.

Des études précédentes ont déjà utilisées le moment contractile (Prager-Khoutorsky et al, 2011 ; Pompe et al, 2008 ; Lee et al, 2012) afin de décrire l'état de polarisation de la cellule en fonction de la rigidité du milieu ; celui-ci augmentant avec la rigidité. Ici nous allons voir par quel moyen le moment contractile ne varie pas tandis que l'énergie contractile augmente, à rigidité constante.

Le moment contractile pouvant être décrit comme le produit de la force par la distance séparant les deux points d'application de celle-ci (Wang et al, 2012), si la force augmente tandis que le moment reste constant alors un changement doit intervenir au niveau de la distance entre les points d'application de ces forces.

2.3 Effet de l'intégrine $\beta 3$ sur la morphologie cellulaire

Dans le but d'explorer cette hypothèse, la morphologie des cellules MEFs déficientes en intégrines $\beta 3$ et réexprimées avec des intégrines $\beta 3$ a été comparée au phénotype sauvage. Pour quantifier la morphologie cellulaire nous avons tout d'abord mesuré l'excentricité cellulaire. Pour cela on a ajusté la cellule au moyen d'une ellipse qui nous permet de calculer l'excentricité correspondant au ratio entre l'axe majeur et l'axe mineur. Nous pouvons voir que la perte de l'intégrine $\beta 3$ n'affecte pas la forme des cellules (Figure III.2.3b). Ce paramètre ne permet donc pas d'expliquer la relation complexe entre l'Ec et le Mu. Nous avons ensuite mesuré l'aire d'étalement des cellules (Figure III.2.3a). Nos résultats nous montrent que la perte de l'intégrine $\beta 3$ mène à une augmentation de l'énergie contractile corrélée à une diminution de l'aire d'étalement des cellules (Figure III. 2.3a) sans changement de leur excentricité (Figure III.2.3b).

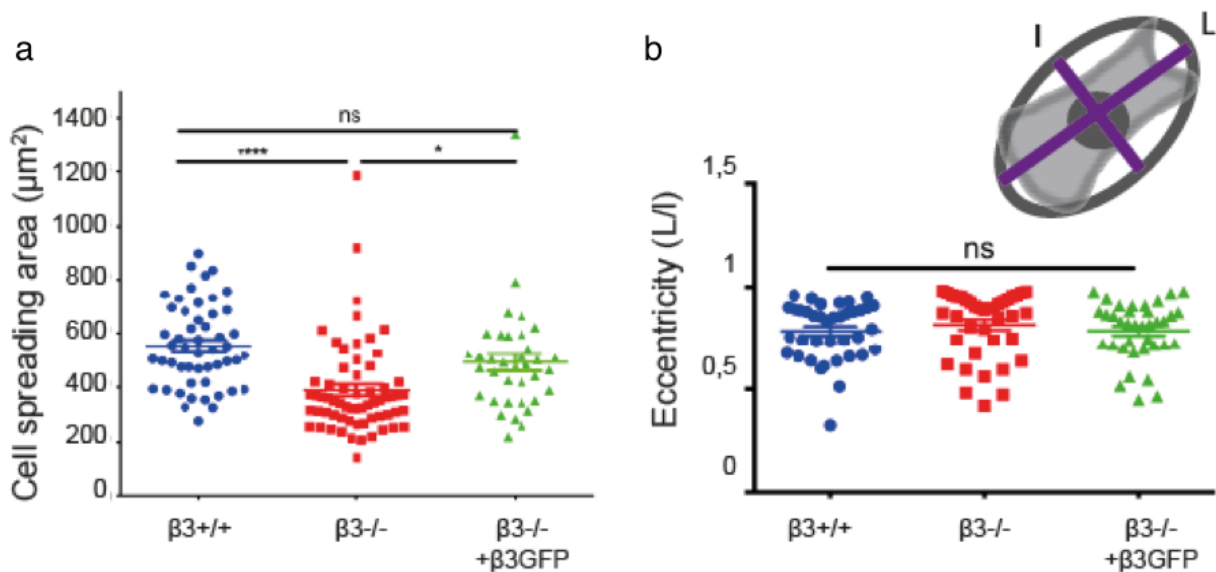


Figure III.2.3 L'augmentation de l'énergie contractile induite par l'absence des intégrines $\beta 3$ est accompagnée d'une diminution de l'aire d'étalement de la cellule (a) sans changer la forme de la cellule tel que mesuré par le paramètre d'excentricité (b). L'excentricité correspond au ratio entre le grand axe (L) et le petit axe (I) et tend vers zéro pour les cellules très allongées ou un pour les cellules équiaxes. $n > 35$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$, ns: non significatif).

Nous pouvons conclure que l'intégrine $\beta 3$ participe au maintien du moment contractile en partie grâce à une régulation positive de l'aire d'étalement de la cellule. Nous nous sommes posé la question de savoir si la stabilité du moment contractile n'est pas aussi associée à une redistribution des points d'application des forces et donc à la position des adhésions focales.

3. L'intégrine $\beta 3$ régule la distribution spatiale et l'état d'activation de l'intégrine $\beta 1$

Dans ce paragraphe nous allons déterminer si le changement de l'aire d'adhésion de la cellule est associée avec une redistribution spatiale des sites d'adhésions intégrines dépendant. Nous avons vu dans la partie précédente que l'intégrine $\beta 1$ a été identifiée comme étant essentielle pour la génération de forces (Figure III.1) et que par ailleurs, l'état d'activation et la spécificité de l'intégrine $\beta 1$ doivent jouer un rôle important étant donné que la sur-activation des intégrines $\beta 1$ via la déplétion du régulateur négatif Icap-1 induit aussi une réorganisation de la distribution des forces dans les cellules HUVEC (Faurobert et al, 2013).

3.1 L'intégrine $\beta 3$ régule négativement l'activation des intégrines $\beta 1$

Nous allons tout d'abord étudier si l'intégrine $\beta 3$ affecte l'état d'activation des intégrines $\beta 1$. Pour cela nous observons l'état d'activation des intégrines $\beta 1$ par immunofluorescence en utilisant un anticorps spécifique (9EG7) aux intégrines $\beta 1$ activées (Bazzoni et al, 1998). Pour quantifier de façon efficace et précise les structures d'adhésion, nous avons développé un programme Matlab capable d'analyser la morphologie des sites d'adhésions ainsi que leur position relative par rapport à la membrane (décrit dans le chapitre II.5).

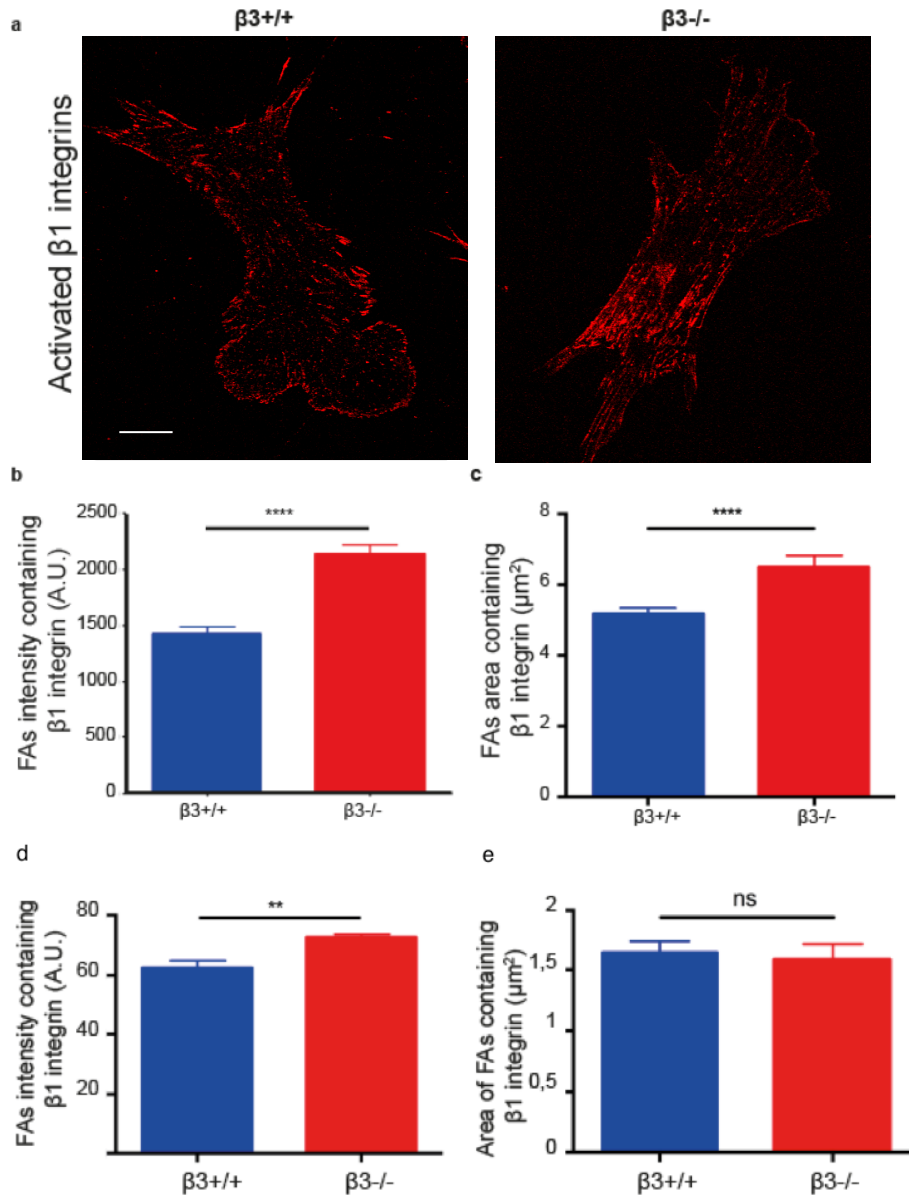


Figure.III.3.1 La délétion des intégrines $\beta 3$ module l'état d'activation et la distribution spatiale des sites d'adhésions contenant les intégrines $\beta 1$. a) Images montrant l'activation des intégrines $\beta 1$ par immunofluorescence (9EG7) après déplétion des MEFs en intégrines $\beta 3$ sur des gels de 5kPa fonctionnalisés en fibronectine. Quantification sur gel (b et c) et sur verre (d et e) de l'intensité de fluorescence et de l'aire des sites d'adhésions contenant des intégrines $\beta 1$ activées, révélant une augmentation des adhésions focales en l'absence des intégrines $\beta 3$. $n=60$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, **** $P<0,0001$, ** $P<0,01$), bar d'échelle= $16\mu m$.

On remarque qu'en l'absence de l'intégrine $\beta 3$, l'intensité et l'aire des sites d'adhésions contenant des intégrines $\beta 1$, augmentent de façon significative en comparaison du WT sur gel et sur verre (Figure III.3.1), démontrant ainsi le rôle de l'intégrine $\beta 3$ dans l'activation et le regroupement des intégrines $\beta 1$. Ce résultat est tout à fait en accord avec l'observation précédente montrant l'augmentation de l'énergie contractile en l'absence de l'intégrine $\beta 3$ (Figure III.2).

3.2 La perte de l'intégrine $\beta 3$ induit une redistribution des intégrines $\beta 1$

Par ailleurs nous savons que le moment contractile traduit la distribution spatiale des forces, or les adhésions focales sont les « centres » d'application de ces forces au sein des cellules. Nous avons montré que, tandis que l'énergie contractile augmente en l'absence de l'intégrine $\beta 3$, le moment contractile reste constant. Ce résultat surprenant nous amène à penser que la distance des points d'application des forces doit donc augmenter pour expliquer la relation entre l'énergie et le moment contractile. Dans le but de confirmer cette hypothèse et soupçonnant un couplage entre les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$, nous avons quantifié la distribution spatiale des adhésions focales en utilisant le programme décrit au paragraphe (II.5).

Nous pouvons observer que les MEFs déficientes en intégrines $\beta 3$ sont caractérisées par une nette augmentation du nombre d'adhésion contenant des intégrines $\beta 1$ activées vers le centre de la cellule (Figure III.3.2). Par conséquent, la distribution spatiale des sites d'adhésions contenant des intégrines $\beta 1$ se déplaceraient de la périphérie vers le centre de la cellules.

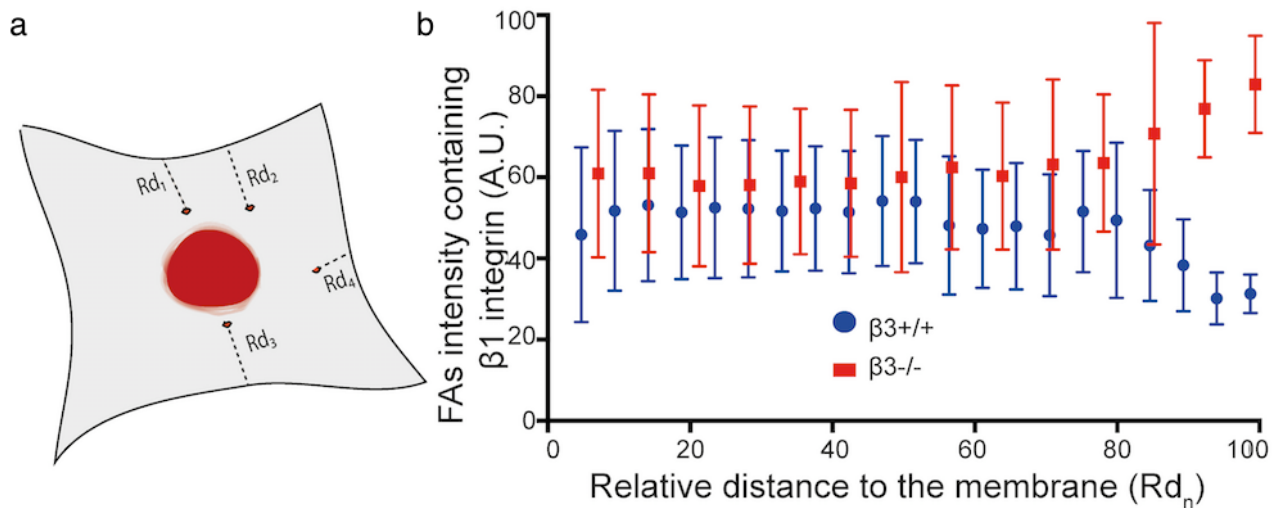


Figure III.3.2 a) La distance relative à la membrane (Rd) de chaque sites d'adhésions contenant des intégrines $\beta 1$ activées est déterminée afin de démontrer le changement de leur distribution spatiale en l'absence des intégrines $\beta 3$. b) Dans les MEF $\beta 3^{-/-}$, la distribution spatiale des sites d'adhésions contenant des intégrines $\beta 1$ est caractérisée par une augmentation significative dans leur formation vers le centre de la cellule sur gel. $n=20$ cellules/condition.

Nos résultats montrent que le maintien du moment contractile observé en l'absence de l'intégrine $\beta 3$ est aussi associé à une réorganisation spatiale des structures d'adhésions contenant les intégrines $\beta 1$.

Par conséquent, l'absence de l'intégrine $\beta 3$ est corrélée avec un changement non seulement dans l'état d'activation des intégrines $\beta 1$ mais aussi dans leur distribution spatiale au sein de la cellule, révélant ainsi la fonction régulatrice de l'intégrine $\beta 3$.

Contrairement à l'intégrine $\beta 1$, la liaison de l'intégrine $\beta 3$ à la MEC n'est pas essentielle pour l'application de grandes forces sur le substrat. Ce qui est plutôt surprenant puisque nos résultats ont montré que la déficience en intégrines $\beta 3$ aboutit en une augmentation significative de l'énergie contractile. L'absence de l'intégrine $\beta 3$ conduisant à la modulation de l'énergie contractile sans changement de son moment contractile, une fonction régulatrice de l'intégrine $\beta 3$ sur l'énergie contractile locale et globale a été suggérée. Le découplage de ces deux paramètres mécaniques amène à penser que l'intégrine $\beta 3$ peut réguler localement les forces appliquées au substrat puis intégrer ces modifications en modifiant globalement son aire d'étalement. Finalement, il apparaît que l'intégrine $\beta 3$ joue un rôle actif dans la régulation des forces de traction. Comme un mécano-régulateur, l'intégrine $\beta 3$ est sensible au changement mécanique de son environnement extracellulaire, cela suggère un rôle crucial de cette molécule dans la mécano-réponse. Cette sensibilité de l'intégrine $\beta 3$, à l'application des forces externes ayant été précédemment démontré par les expériences utilisant les pinces magnétiques sur des billes étalées à travers la surface dorsale d'une cellule indépendamment de son interface cellule/MEC. Ici l'inhibition ou la déplétion de l'intégrine $\beta 3$ montrent son importance dans la transduction des forces en une réponse de renfort au sein du cytosquelette (Roca-Cusach et al, 2009).

Par conséquent l'intégrine $\beta 3$ apparaît comme un régulateur spatial négatif des mécanismes dépendant de l'intégrine $\beta 1$ via l'énergie contractile, et l'intégrine $\beta 3$ participerait à la stabilisation du moment contractile en partie à travers une régulation positive de l'aire d'étalement des cellules.

4. La phosphorylation du second site NPxY est impliquée dans la régulation de l'énergie contractile par l'intégrine $\beta 3$

Afin de proposer une explication moléculaire pour ce processus, différents mutants de l'intégrines $\beta 3$ ont été ré-exprimés dans les cellules dépourvues d'intégrines $\beta 3$ afin de comprendre quelle partie de l'intégrine $\beta 3$ est impliquée dans cette régulation des forces de traction cellulaires ; quel chemin de signalisation moléculaire est à la base de ce mécanisme.

4.1 Description des différentes mutations de l'intégrine $\beta 3$

La mutation de l'intégrine $\beta 3$ est ciblée de façon à moduler ses interactions avec des mécano-régulateurs déjà décrit dans la littérature (Legate et Fassler 2009 ; Moore et al, 2012 ; Chapitre 1.2.3). Les mutations de l'intégrine $\beta 3$ affectant la phosphorylation des sites d'interactions avec des activateurs d'intégrines, la taline (sur le premier motif NPxY (Y772F)) ou avec le co-activateur d'intégrine la kindline (Y784F), ont été générés pour les comparer avec des mutations ciblant la signalisation de l'intégrine $\beta 3$. Ces dernières bloquant notamment les interactions entre la kinase FAK et la paxilline (D784A, E751A) et Src (délétion du troisième acide aminé, R785 stop) (Figure III.4.1). La forme constitutivement activée de $\beta 3$ (N304T) a également été incluse.

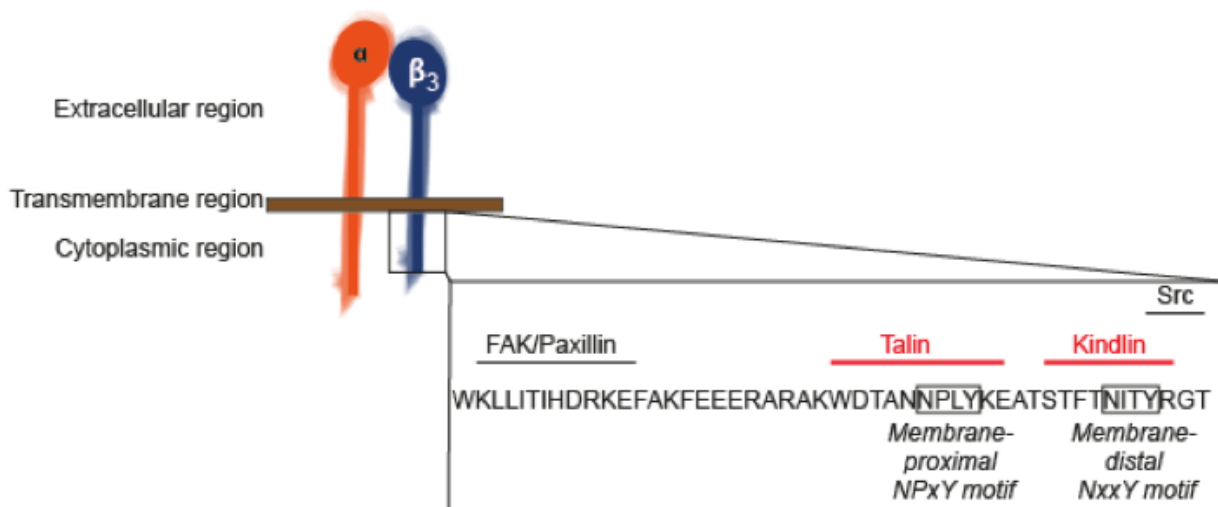


Figure III.4.1 Schéma de la queue cytoplasmique de l'intégrine β_3 . Les sites de liaisons des molécules adaptatrices sont indiqués par une ligne.

4.2 La kindline est impliquée dans la régulation de l'énergie contractile via son interaction avec l'intégrine β_3

Tous les mutants ont été exprimés dans les MEFs déficientes en intégrines β_3 et testées pour leur capacité à rétablir les propriétés mécaniques du phénotype sauvage. Pour cela, j'ai procédé de la même manière que pour les expériences de TFM précédentes, c'est à dire que j'ai déposée les cellules sur des gels de PAA de 5kPa fonctionnalisés avec 30 $\mu\text{g/mL}$ de fibronectine. Bien que la plupart des cellules exprimant ces mutants restaurent l'énergie contractile, seule la mutation affectant la phosphorylation du second site NPxY (Y784F) ne rétablit pas l'énergie contractile, indiquant la fonction essentielle de la phosphorylation du site de liaison à la kindline dans la régulation de l'énergie

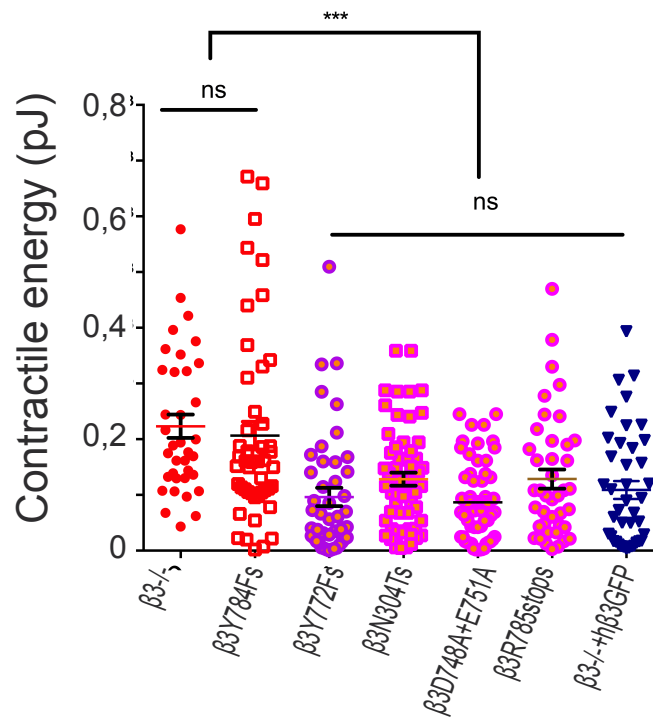


Figure III.4.2 Les mutants de $\beta 3$ marqués avec de la GFP sont exprimés dans les cellules $\beta 3^{-/-}$ afin de révéler les régulateurs de l'énergie contractile impliqués en aval de $\beta 3$. Sur les gels de 5kPa fonctionnalisés avec de la fibronectine, seule la mutation affectant la phosphorylation du site de liaison de la kindline est incapable de rétablir l'énergie contractile caractéristique des cellules WT. $n > 40$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, ns: non significatif).

contractile (Figure III.4.2).

4.3 Analyse du moment contractile et de l'aire d'étalement des cellules

Etonnement, mais de manière cohérente avec les résultats trouvés ci-dessus (Figure III.2.2), l'expression de la plupart de ces mutants n'affecte pas le mécanisme de compensation menant au maintien du moment contractile et à la distribution spatiale des forces. Seule la mutation affectant la phosphorylation du second site NPxY de l'intégrine $\beta 3$ (Y784F) mène à une augmentation du moment contractile (Figure III.4.3a), elle même corrélée avec une augmentation spécifique dans l'aire d'étalement des cellules (Figure III.4.3b), suggérant un rôle

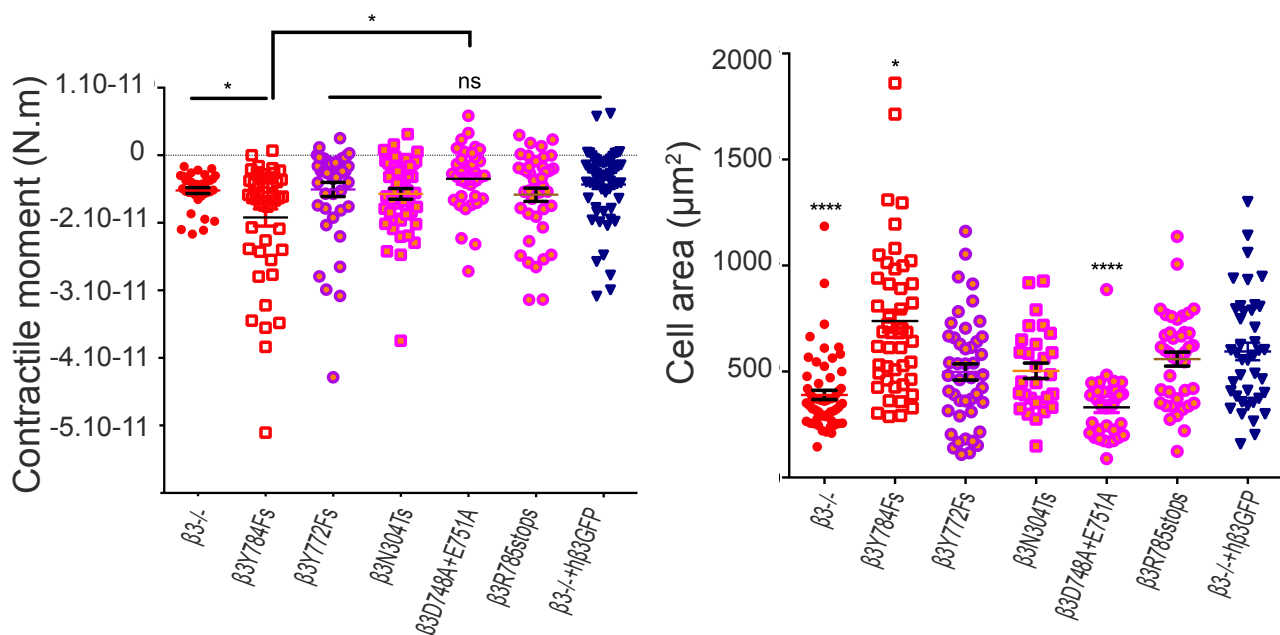


Figure III.4.3 Seul le mutant de $\beta 3$ inhibant la phosphorylation du site de liaison de la kindline est incapable de maintenir le moment contractile et l'aire d'étalement tel qu'observé dans les cellules WT, révélant des fonctions différentes pour la kindline et la taline dans la mécano- régulation. $n > 40$ cellules/condition (moyenne \pm s.e.m, ANOVA test de Tuckey, **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, ns: non significatif).

spécifique de la kindline dans la régulation de la surface de la cellule via ses interactions avec l'intégrine $\beta 3$.

Nos résultats montrent que la taline et la kindline présentent des fonctions mécaniques distincts dans le contrôle des activités mécaniques dépendant des intégrines $\beta 3$. Cependant, des données récentes montrent que la taline n'est pas recrutée dans les adhésions focales par les intégrines, mais serait plutôt localisée dans ces sites pour lier et activer les intégrines (Rossier et al, 2012). Dans la suite de ces travaux nous avons voulu déterminer si la taline et la kindline sont présentes en amont du recrutement des intégrines $\beta 3$ ou si $\beta 3$ est essentielle pour recruter ces protéines dans les sites d'adhésions.

4.4 La taline et la kindline sont recrutées en amont de l'intégrines $\beta 3$

Pour cela nous avons tout d'abord marqué en fluorescence les cellules WT et déficientes en $\beta 3$ en utilisant deux anticorps spécifiques reconnaissant la taline et la kindline. Puis nous avons ensuite quantifié le degré de corrélation de ces deux protéines en traçant leur profil d'intensité pour chaque phénotype et en calculant ensuite le coefficient de Pearson. Ce dernier nous révèle que la taline et la kindline sont très colocalisées dans les cellules WT et déficientes en $\beta 3$ (Figure III.4.4).

Ensuite, dans le but de savoir si la taline et la kindline sont présentes en amont du recrutement de l'intégrine $\beta 3$ ou si l'intégrine $\beta 3$ est essentielle pour recruter ces deux protéines dans les sites d'adhésions, nous avons quantifié le ratio de colocalisation de la taline et de la kindline dans chaque structure d'adhésion des cellules $\beta 3^{+/+}$ et $\beta 3^{-/-}$ en utilisant le programme expliquer en II.5 (Figure III.4.5).

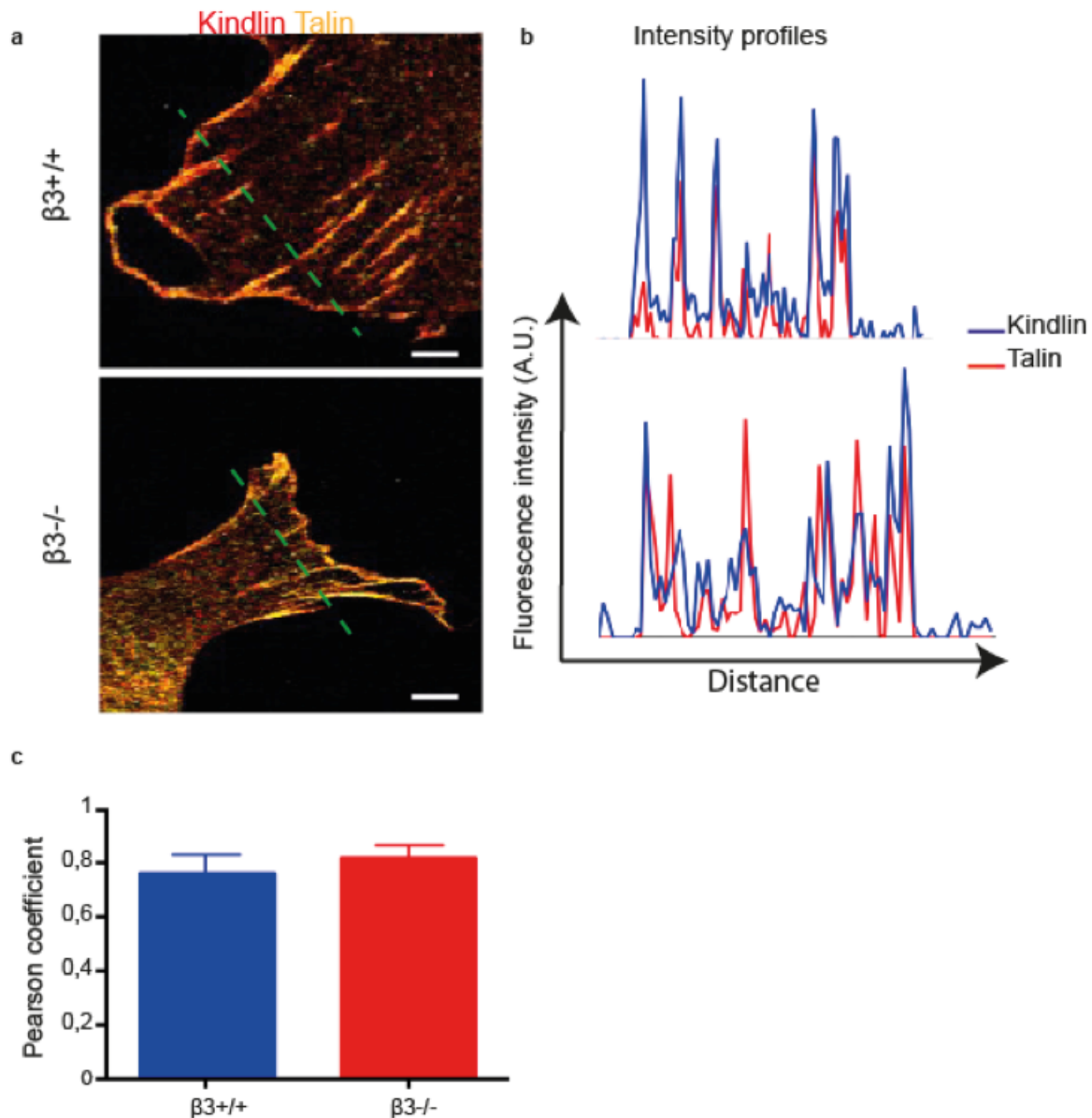


Figure III.4.4 La colocalisation de la taline et de la kindline n'est pas régulée par l'intégrine $\beta 3$. a) Zoom d'une image « merged » montrant la localisation de la kindline (rouge) et de la taline (jaune) dans les cellules $\beta 3^{+/+}$ et $\beta 3^{-/-}$ adhérentes sur des gels de 5kPa fonctionnalisés à la fibronectine. b) Profile d'intensité de fluorescence (unité arbitraire) mesuré le long de la ligne en pointillés vert montrant la colocalisation entre la taline et la kindline. c) Quantification du degré de corrélation via le coefficient de Pearson confirmant le haut degré de corrélation de ces deux protéines (1= colocalisation parfaite, 0= distribution non corrélée). $n=5$ cellules/ condition (moyenne \pm s.e.m). Bar d'échelle=6 μ m.

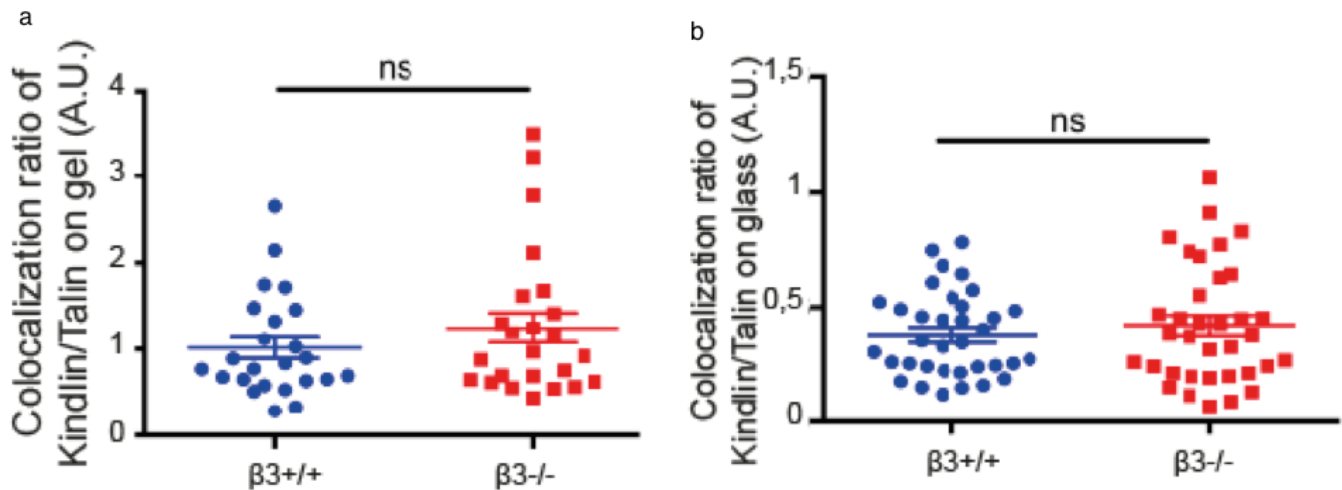


Figure III.4.5 L'intégrine $\beta 3$ n'affecte pas le ratio de colocalisation ni sur verre ni sur gel de 5kPa. $n=20$ cellules/condition et $n>800$ adhésions focales (moyenne \pm s.e.m, ANOVA, test de Tuckey, ns: non significatif).

On remarque que l'absence de l'intégrine $\beta 3$ n'affecte pas le ratio taline/kindline dans les cellules étalées (Figure III.4.5). Par conséquent, nous pouvons en déduire que la taline et la kindline agissent en amont de l'intégrines $\beta 3$ et contrôlent son recrutement dans les sites d'adhésions focales afin de réguler l'énergie contractile de la cellule.

De façon surprenante, aucune interaction entre l'intégrine $\beta 3$ et des molécules de signalisation telles que FAK, la paxilline et Src ne sont impliquées dans l'activité régulatrice de l'intégrine $\beta 3$. Cependant, la taline et la kindline, toutes deux partenaires dans l'activation de l'intégrine $\beta 3$, sont aussi impliquées dans le couplage mécanique entre les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (Figure III.4.2). En effet, les mutations affectant les sites de liaison à la taline et à la kindline ne sont pas capables de restaurer la capacité de $\beta 3$ à réguler l'Ec appliquée au substrat. De

plus, l'intégrine $\beta 3$ régule négativement l'activation de l'intégrine $\beta 1$, sa distribution spatiale au sein des adhésions focales et son énergie contractile mais sans changer le ratio taline/kindline. Ce qui nous suggère l'idée que les intégrines $\beta 3$ agissent en aval du recrutement de ces protéines dans les plaques d'adhésion.

Ce résultat nous amène à proposer un modèle où les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ peuvent être en compétition pour la liaison à la taline et à la kindline au sein d'un même site d'adhésion permettant ainsi la modulation de la réponse mécanique. En effet, de récentes études utilisant le PALM ont montré que la taline ne diffuse pas à la membrane avec les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ mais est maintenue dans les sites d'adhésions pour recruter et activer localement ces deux intégrines (Rossier et al, 2013). De plus ce modèle de compétition est aussi appuyé par les affinités respectives du domaine cytoplasmique des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ pour la taline. En effet, le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ a une affinité deux fois plus petite pour la taline que celui du domaine cytoplasmique de l'intégrine de $\beta 3$ (Anthis et al, 2009).

Par conséquent, l'intégrine $\beta 3$ apparaît comme un régulateur des forces de traction en modulant l'activation et la distribution spatiale des intégrines $\beta 1$.

5. L'intégrine $\beta 3$: un régulateur temporel de l'activité contractile cellulaire

Après avoir démontré la régulation spatiale des intégrines $\beta 1$ par l'intégrine $\beta 3$, nous allons maintenant déterminer si l'intégrine $\beta 3$ peut réguler temporellement l'énergie contractile de la cellule. Pour cela, nous avons suivi la

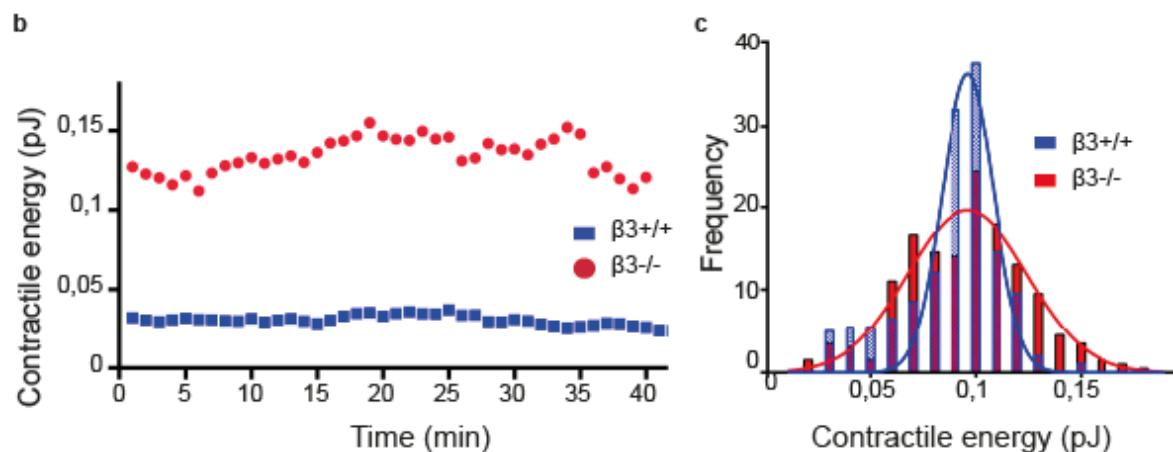
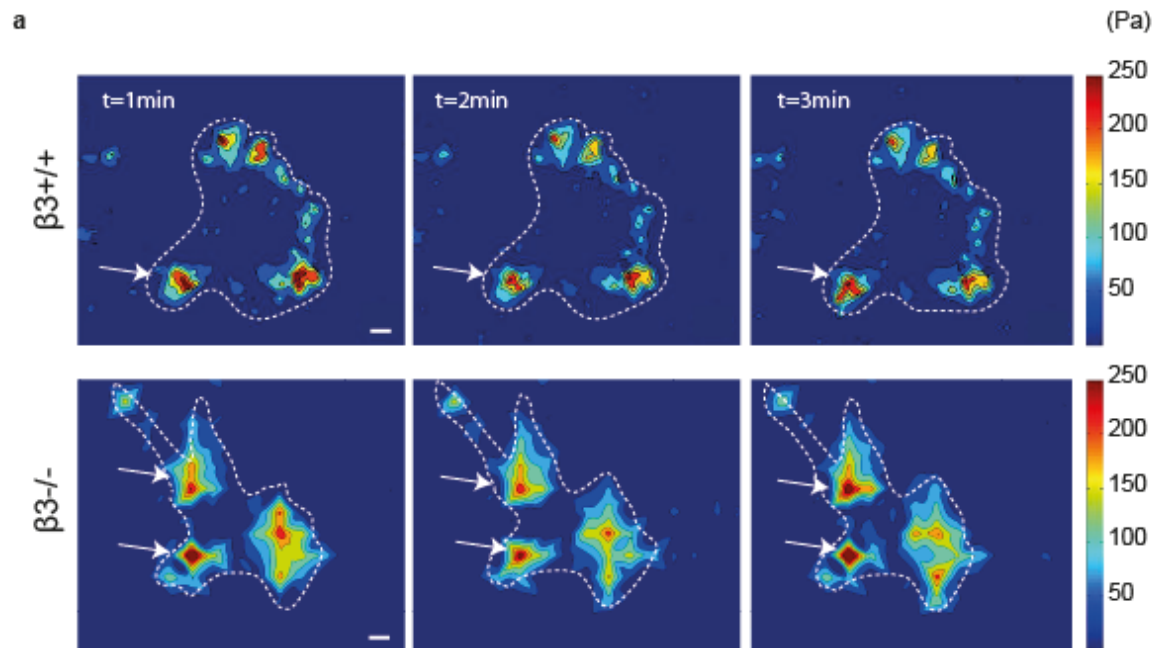


Figure III.5 L'intégrine $\beta 3$: un régulateur temporel de la stabilité mécanique cellulaire. a) Succession d'images extraites à partir des observations de TFM sur des cellules WT (haut) et $\beta 3^{-/-}$ (bas). La carte de pression au cours du temps nous révèle que les cellules WT développent des contraintes plus stables comparées aux cellules $\beta 3^{-/-}$ (flèches blanches). b) Graphe montrant l'évolution de l'énergie contractile au cours du temps de cellules étalées sur des gels de rigidité 5kPa fonctionnalisés avec de la fibronectine, révélant le rôle essentiel de l'intégrine $\beta 3$ dans le maintien de la stabilité de l'Ec. c) Histogramme illustrant les oscillations de l'énergie contractile. La distribution de l'énergie contractile exhibe un écart type plus bas pour les cellules WT ($SD=0,12J$) que pour les $\beta 3^{-/-}$ ($SD=0,28J$). $n>4$ cells/condition. Bar d'échelle= $10\mu m$.

modulation de l'énergie contractile transmise par une cellule unique au cours du temps en utilisant la technique de TFM résolue en temps (Figure III.5a et b).

Comme démontré précédemment, nous avons confirmé que l'absence de l'intégrine $\beta 3$ était associée avec une augmentation significative de l'énergie contractile. Par ailleurs, nos résultats nous montrent que les MEFs WT sont caractérisées par une grande stabilité de l'énergie contractile au cours du temps, reflétant ainsi la notion d'homéostasie tissulaire dans laquelle il existe un équilibre des tensions (Butcher et al, 2009). En revanche, les cellules MEFs déficientes en intégrines $\beta 3$ affichent une grande instabilité dans leur activité contractile au cours du temps (Figure III.5a et b). Afin de quantifier cet effet, la distribution normalisée du spectre d'amplitude de l'énergie contractile a été calculée. Pour cela j'ai tracé la fréquence d'apparition en fonction de l'énergie contractile que j'ai ensuite ajusté par une Gaussienne afin de pouvoir calculer l'écart type du spectre d'amplitude. On peut observer que les MEFs $\beta 3^{-/-}$ ont une distribution significativement plus large révélant un rôle important de l'intégrine $\beta 3$ dans le maintien de la stabilité de l'énergie contractile (Figure III.5c).

En conclusion, tandis que l'intégrine $\beta 1$ apparaît comme crucial pour la génération de forces, notre étude a identifié l'intégrine $\beta 3$ comme un nouveau régulateur spatial négatif limitant et stabilisant les contraintes locales et globales appliquées à un substrat à l'échelle de la minute.

Conclusion et perspectives

1. Conclusion

Nous avons montré que les fibroblastes évoluant dans un environnement composé de fibronectine font intervenir deux types d'intégrines: les intégrines $\beta 1$ et les intégrines $\beta 3$ afin d'orchestrer la contractilité cellulaire.

L'utilisation d'une approche génétique nous a permis de déterminer la conséquence de la perte d'une protéine spécifique tandis que les expériences de contrôles nous ont permis de montrer la spécificité de ce chemin de signalisation. Nous avons démontré que la perte de l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules MEFs induit une diminution de la génération de forces tandis que les cellules déficientes en intégrines $\beta 3$ développent une énergie contractile supérieure à celle des cellules sauvages révélant la fonction régulatrice de l'intégrine $\beta 3$; cette dernière étant dépendante de sa capacité à lier à la fois la taline et la kindline.

De plus l'analyse du moment contractile nous a permis d'évaluer la distribution spatiale des forces de traction et d'explorer la manière dont ce paramètre est régulé par l'aire de la cellule et la modification spatiale des sites d'adhésions (correspondant aux points d'application des forces). En effet, l'augmentation de l'énergie contractile dans les cellules déficientes en intégrines $\beta 3$ est associée non seulement à une diminution de l'aire d'étalement mais également à un changement à la fois de l'état d'activation et de la distribution spatiale des intégrines $\beta 1$.

Les expériences de microscopie à traction de forces au cours du temps sur les MEFs WT ou $\beta 3^{-/-}$ montrent clairement que l'intégrine $\beta 3$ régule temporellement l'énergie contractile, telle que révélée par les oscillations de l'Ec au cours du temps. Démontrant ainsi que l'intégrine $\beta 3$ agit comme un régulateur capable de

stabiliser et de fixer le seuil supérieur de l'énergie contractile produite par les cellules au cours du temps.

Etant donné que l'intégrine $\beta 1$ se manifeste comme étant le principal effecteur dans l'application des forces aux substrats chez les MEFs, nous faisons l'hypothèse que l'intégrine $\beta 3$ peut réguler l'activité de l'intégrine $\beta 1$. De plus une étude précédente réalisée sur un substrat de verre a montré que la déplétion des intégrines $\beta 3$ conduisait à une augmentation de l'activation des intégrines $\beta 1$ (Worth et al, 2010). Par ailleurs notre étude confirme la capacité de l'intégrine $\beta 3$ à réguler négativement l'état d'activation de l'intégrine $\beta 1$ sur des substrats rigides et mous (Figure III.3.1 et III.3.2), ce qui explique probablement pourquoi la déplétion des intégrines $\beta 3$ est associée à augmentation des forces dépendantes de l'intégrine $\beta 1$.

Nos données nous permettent de confirmer un modèle selon lequel l'activité contractile est globalement régulée par l'intégration des effets de plusieurs sites d'adhésions où l'intégrine $\beta 1$ est activée.

En conclusion, nos résultats indiquent que l'intégrine $\beta 3$ contribue au changement spatio-temporel des sites d'adhésions en modulant le regroupement des intégrines $\beta 1$ et par conséquent participe à la régulation des forces de traction. Nous faisons l'hypothèse que l'intégrine $\beta 3$ va lier plus facilement la taline que l'intégrine $\beta 1$, cohérent avec la présence de la taline dans les adhésions focales. Ce modèle de compétition résulterait en un changement dans l'état d'activation de l'intégrine $\beta 1$ et donc la redistribution spatiale des adhésions focales contenant les intégrines $\beta 1$. La déplétion en intégrine $\beta 3$ favoriserait alors les interactions entre la taline et les intégrines $\beta 1$ menant à l'activation d'une voie de signalisation spécifique en aval telle que VASP-RIAM ou RhoA-ROCK-myosine-II (Worth et al, 2010 ; Schiller et al, 2013). La compétition entre la taline

et la kindline pour réguler la génération de forces peut-être comparée à celle entre la taline et l' α -actinine pour la liaison à l'intégrine $\beta 3$ dans la maturation des adhésions focales (Roca-Cusach et al, 2013).

2. Ouverture: l'optogénétique, une approche dynamique de la modulation de l'intégrine $\beta 1$ par $\beta 3$ dans la génération de forces

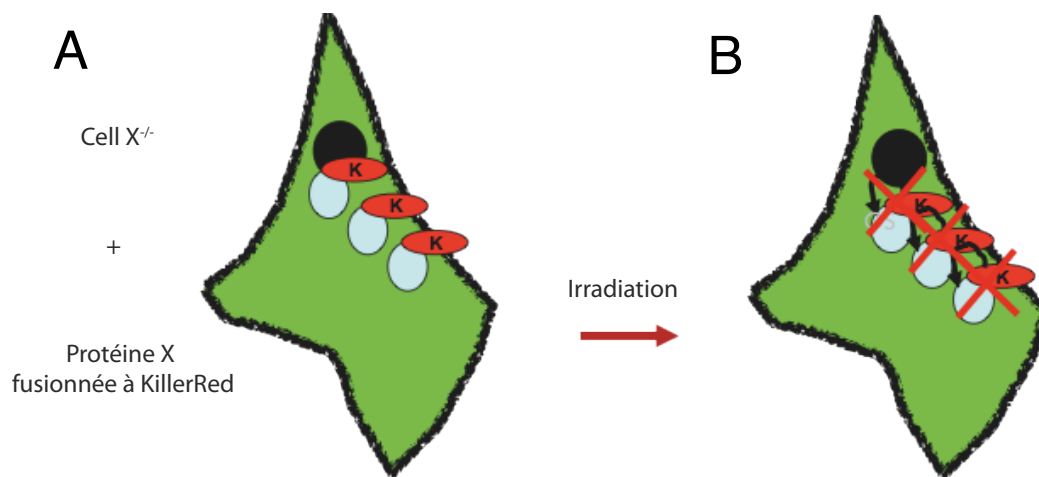


Figure III.6.1 Principe de l'optogénétique. A) On fusionne killer red à la protéine cible préalablement supprimée de la cellule hôte. B) Sous irradiation, la protéine killer red libère des ROS qui vont inactiver localement la protéine sur laquelle elle est fusionnée.

La fonction des intégrines dépendant énormément de leur dynamique, il n'est pas possible de les moduler avec des approches génétiques classiques. Le désavantage de ces approches classiques étant le décalage dans le temps entre

la perte de fonction (plusieurs jours) et l'observation de la dynamique du système, caractéristique essentielle de ces protéines et de leur coopération dans la réalisation du processus de mécanotransduction. C'est pourquoi il serait intéressant de combiner la technique d'optogénétique avec la microscopie à traction de force résolue en temps (TFMt) pour induire des transitions génétiques dynamiques sur cellule unique afin de déterminer le couplage entre la dynamique d'activation des intégrines et les forces cellulaires.

L'optogénétique est une nouvelle technique basée sur des méthodes génétiques et d'optiques ayant pour but d'induire des pertes de fonction d'une protéine de l'ordre de la minute et donc d'induire des transitions génétiques dynamiques sur cellule unique (Bulina et al, 2006; Carpentier et al, 2009; Destaing et al, 2010; Figure III.6.1).

Une première expérience combinant l'optogénétique et la TFMt a permis pour la première fois d'induire une photo-inactivation de l'intégrine $\beta 1$ et de suivre l'évolution de l'énergie contractile transmise par la cellule au cours du temps (Figure III.6.2).

Nous pouvons observer que la chute de l'énergie contractile, telle que vue dans le chapitre III.1, a lieu immédiatement (quelques secondes) après l'irradiation.

Ainsi nous pourrions déterminer le couplage entre la dynamique de l'activation des intégrines et les forces cellulaires en réponses. Ce type de système biologiques permettant ainsi de compléter des approches génétiques classiques de perte d'expression et de pouvoir explorer les équilibres biomécaniques des systèmes dynamiques.

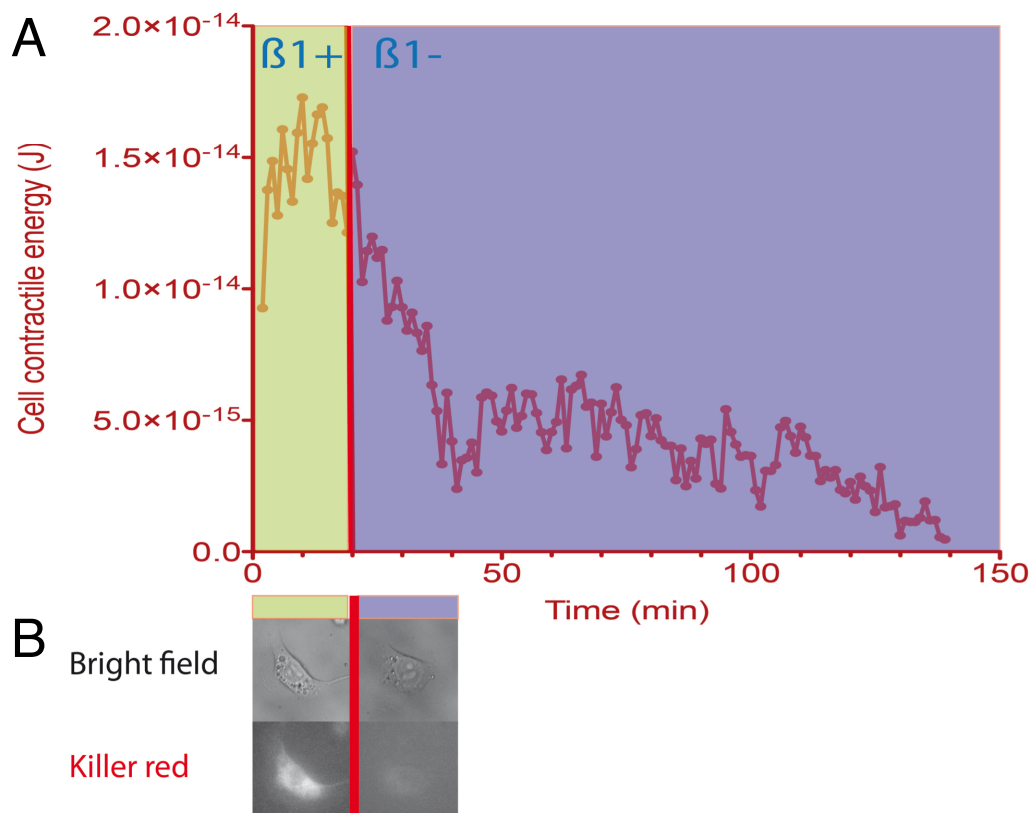


Figure III.6.2 L'inactivation de l'intégrine $\beta 1$ par photo-inactivation révèle son rôle dans la génération de forces dynamiques sur cellule unique (la ligne rouge verticale correspond à la photo-inactivation de l'intégrine). A) Graphique de l'énergie contractile développée par une cellule transfectée avec des intégrines $\alpha 5\beta 1$ fusionnées à une protéine killer-red photosensible. Durant les vingt premières minutes $\alpha 5\beta 1$ est exprimée par la cellule puis après 40s d'irradiation, l'expression des $\beta 1$ est supprimée sur l'intégralité de la cellule affectant l'énergie contractile de façon drastique. B) Image d'une séquence juste avant l'irradiation (gauche) puis juste après l'irradiation (droite).

Dans le chapitre précédent (Chapitre III), nous avons vu que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ coopèrent dynamiquement pour le maintien de la stabilité de l'activité contractile de la cellule. L'intégrine $\beta 1$ étant le principal effecteur de la génération des forces de traction et l'intégrine $\beta 3$ jouant le rôle de régulateur spatio-temporel de l'énergie contractile en modulant la distribution spatiale et l'état d'activation de l'intégrine $\beta 1$.

Dans la suite de cette thèse et dans le cadre de collaborations, nous allons voir la manière dont ces forces mécaniques sont exprimées dans les cellules endothéliales et coordonnent l'expansion de la lumière aortique permettant l'initiation de la circulation sanguine. Ainsi que l'importance de cette activité contractile dans la formation des proplaquettes, elle-même impliquée dans la réparation de ces vaisseaux sanguins. Pour cela nous avons utilisé la technique de microscopie à traction de forces nous permettant d'accéder aux forces intercellulaires. Ou encore d'utiliser la TFM comme un outil diagnostique dans le Syndrome MYH9 afin de comprendre le défaut de production des proplaquettes produites par les mégacaryocytes.

Chapitre IV. AmotL2 lie les VE cadhérines aux fibres d'actines contractiles nécessaires à l'extension de la lumière aortique

1. Contexte

Le rôle fondamental de la circulation artérielle est d'apporter aux organes les nutriments et l'oxygène nécessaire.

Au cours des premiers stades de l'embryogenèse, le développement embryonnaire se fait en absence de vascularisation, la simple diffusion des éléments nutritifs du sang assure la demande métabolique de l'embryon. L'embryon se transforme alors progressivement en un organisme vascularisé, c'est à dire en une entité dépendante fonctionnellement du plexus capillaire et des vaisseaux sanguins. La vasculogenèse fait référence aux événements initiaux de la croissance vasculaire au cours desquels les précurseurs des cellules endothéliales (nommés angioblastes), migrent, se différencient in situ et s'organisent pour former le réseau vasculaire primitif. Le système vasculaire commence à se former à 7.5 jours post-coïtum chez la souris ; les angioblastes qui ont migré dans le mésoderme du tissu embryonnaire s'assemblent en agrégats qui se différencient ultérieurement en tubes endocardiques à l'origine de la formation de l'aorte dorsale (Figure IV.1), des veines cardinales et des ébauches embryonnaires des veines et des artères du sac vitellin⁹. A la suite de la formation du système vasculaire primitif, les cellules endothéliales peuvent participer à la croissance de nouveaux capillaires à partir des micro-vaisseaux originels par un processus appelé angiogenèse. L'angiogenèse se définit par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.

Dans cette article nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à la formation de la lumière aortique permettant l'initiation de la circulation sanguine. Trois composants ont été identifiés comme essentiels pour la formation de celle-ci: le cytosquelette, la polarité de la cellule et l'adhésion cellule/cellule; la lumière

⁹ à l'origine d'une partie de l'intestin, joue un rôle dans la production des premières cellules sanguines et des premiers vaisseaux

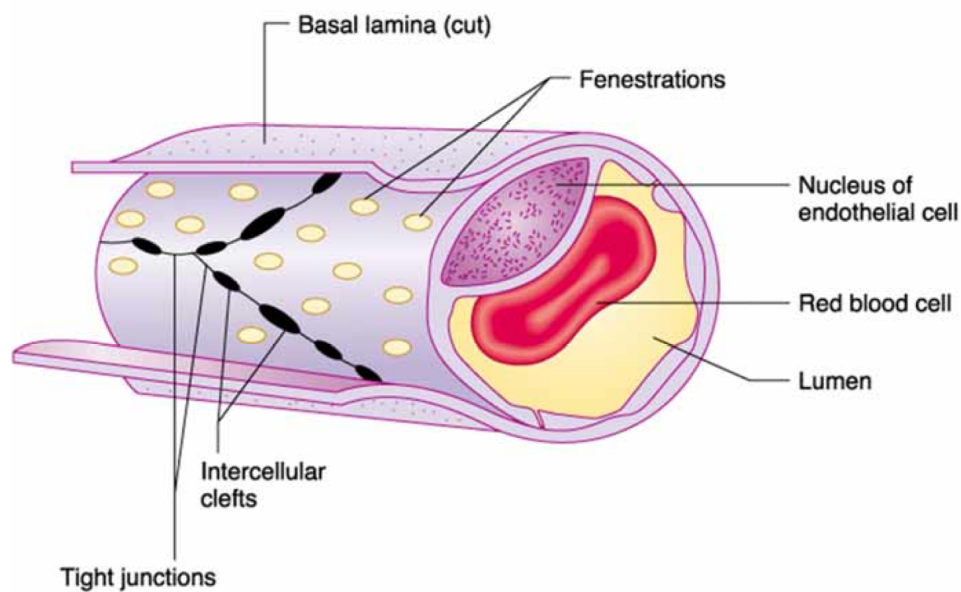
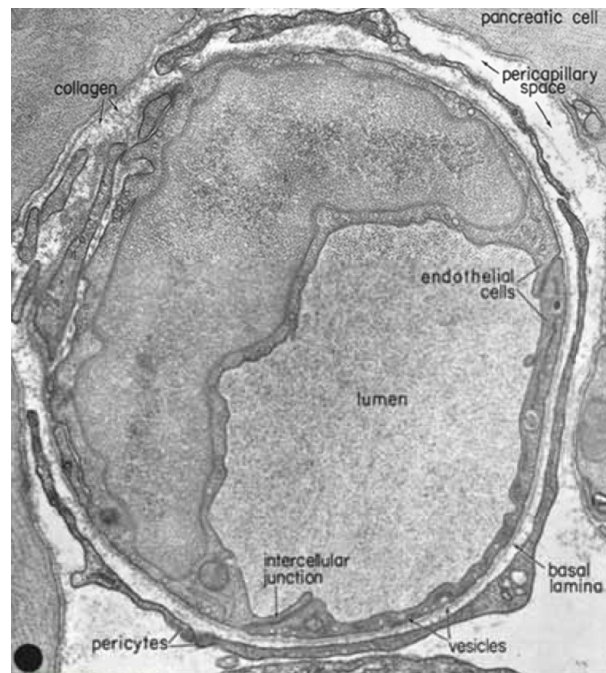


Figure IV.1 Structure d'un capillaire. a) Coupe d'un vaisseau sanguin. b) Schéma de la coupe d'un vaisseau sanguin, la couche la plus interne du vaisseau est l'endothélium. C'est une couche mono-cellulaire, c'est-à-dire qu'elle est constituée d'une seule couche de cellules, les cellules endothéliales. Ces cellules sont impliquées dans le maintien d'une certaine fluidité du sang (cours du Dr. Pelletier, Université Joseph Fourier).

aortique présentant des défauts de fabrication en leurs absences.

Beaucoup d'études ont montré l'importance du facteur de croissance VEGF qui semble jouer un rôle crucial dans l'angiogenèse et donc la formation des vaisseaux sanguins (Herbert et Stainier, 2011). En revanche la manière dont les cellules endothéliales perçoivent et transmettent des forces mécaniques dans le but de moduler la forme des vaisseaux et leur fonction reste mal connue. Plusieurs études ont montré que les forces extra-cellulaires détectées par les cellules endothéliales se font via les intégrines contenues dans les adhésions focales formant le point de contact permettant le transfert des forces de la MEC au cytosquelette d'actine (Ingber, 2008) mais aussi que la contractilité actomyosine peut-être transmise via les jonctions adhérentes (Leckband et al, 2011).

Dans les cellules endothéliales, les cadhérines Endothéliales Vasculaires (VE) jouent un rôle clé dans la formation des jonctions adhérentes. Il a été montré que les VE-cadhérines sont très importantes pour la perméabilité endothéliales (Gulino et al, 1998) ainsi que pour l'organisation du réseau vasculaire (Vittet et al, 1997). En effet, il a été montré que lorsque l'on neutralise leur activité à l'aide d'un anticorps on observe une dissociation des jonctions adhérentes et donc une augmentation de la perméabilité et que lorsque l'on inactive le gène, il en résulte l'impossibilité de faire un réseau vasculaire organisé correctement.

De plus, des études récentes ont démontré que le domaine intracellulaire des VE-cadhérines interagit avec des filaments d'actines par l'intermédiaire de protéines adaptatrices appelées caténines leurs permettant de réguler le réseau d'actine (Millan et al, 2010).

Cependant bien que les VE-cadhérines semblent jouer un rôle crucial dans la transmission de forces, sa connection moléculaire au cytosquelette d'actine reste obscure.

Par ailleurs, plusieurs études ont également montré que la famille des motines, composée d'angiomotines, d'*angiomotin-like 1* et d'*angiomotin-like 2*, est impliquée dans la migration cellulaire, les jonctions cellule-cellule et l'angiogenèse. Des analyses ont montré que les angiomotines coordonneraient la migration cellulaire et la forme cellulaire en faisant intervenir l'activité de RhoA et donc affectant la formation des fibres de stress (Zheng et al, 2009).

Dans cet article, nous adressons la question de savoir comment les cellules endothéliales intègrent les forces mécaniques via leurs jonctions adhérentes durant la formation de la lumière aortique en suggérant l'intervention d'un complexe AmotL2/VE-cadhérines.

2. Résultats

Dans cet article il a été tout d'abord démontré (en utilisant la techniques des morpholinos¹⁰ sur des zébrafish et des souris) que la protéine AmotL2 était exprimée dans les cellules endothéliales et qu'elle était nécessaire pour la morphogenèse de la lumière aortique dorsale. En effet, l'inactivation de celle-ci provoque un défaut dans la formation de la lumière résultant en une mort prématurée de l'embryon.

¹⁰ Technologie utilisée pour bloquer l'accès d'autres molécules aux séquences spécifiques de certaines molécules d'acide nucléique. Les morpholinos ne dégradent pas les molécules d'ARN auxquelles ils se fixent. Ils agissent par encombrement stérique, en se fixant sur leur séquence cible sur un ARN. Il permet d'inactiver l'expression d'un gène.

La formation de la lumière aortique dépendant principalement de la prolifération des cellules, de leur morphologie ou de leur polarité, chacun de ces paramètres a donc été étudié avec ou sans la présence de la protéine AmotL2. Les analyses ont révélé que la protéine affectait la morphologie des cellules endothéliales puisqu'en l'absence de celle-ci, les cellules sont moins allongées (selon l'axe antéro-postérieur) tandis que le nombre de cellule reste inchangé.

Afin de savoir si le défaut d'élongation des cellules est due à des perturbations de l'architecture du cytosquelette, l'organisation du cytosquelette a été analysée. Un défaut dans les filaments d'actines ancrés dans les jonctions cellulaires VE-cadhérine a été observé, en revanche la formation de ces jonctions et l'établissement de la polarité apico-basal restent intact. Ces résultats nous suggèrent donc que la protéine AmotL2 régulerait l'organisation du cytosquelette dans l'endothélium et que les cellules endothéliales s'allongeraient selon l'axe antéro-postérieur.

Ensuite afin de mieux comprendre le rôle de AmotL2, l'approche de la délétion génétique (ARNsi) permettant de rendre silencieux un gène est utilisée sur des souris flanquées de sites LoxP. Les analyses montrent que 80% des souris mutantes présentent un défaut dans la formation de la lumière aortique et que les cellules endothéliales exhibent une forme très arrondie. Ainsi l'inactivation d'AmotL2 induit un collapsus aortique mais la migration endothéliale reste intact maintenant ainsi le développement normal des lumières veineux. L'hypothèse avancée pour expliquer cette différence serait que les vaisseaux veineux ne dépendraient pas des forces générées dans les adhésion cellulaires pour permettre l'expansion du lumière. La formation de la lumière aortique quant à elle dépendrait de l'accumulation de la pression du fluide sanguins et de la contraction de l'actine.

Dans le but de comprendre comment AmotL2 régule l'architecture de l'actine, des expériences ont été réalisées afin de localiser plus précisément cette protéine. Il

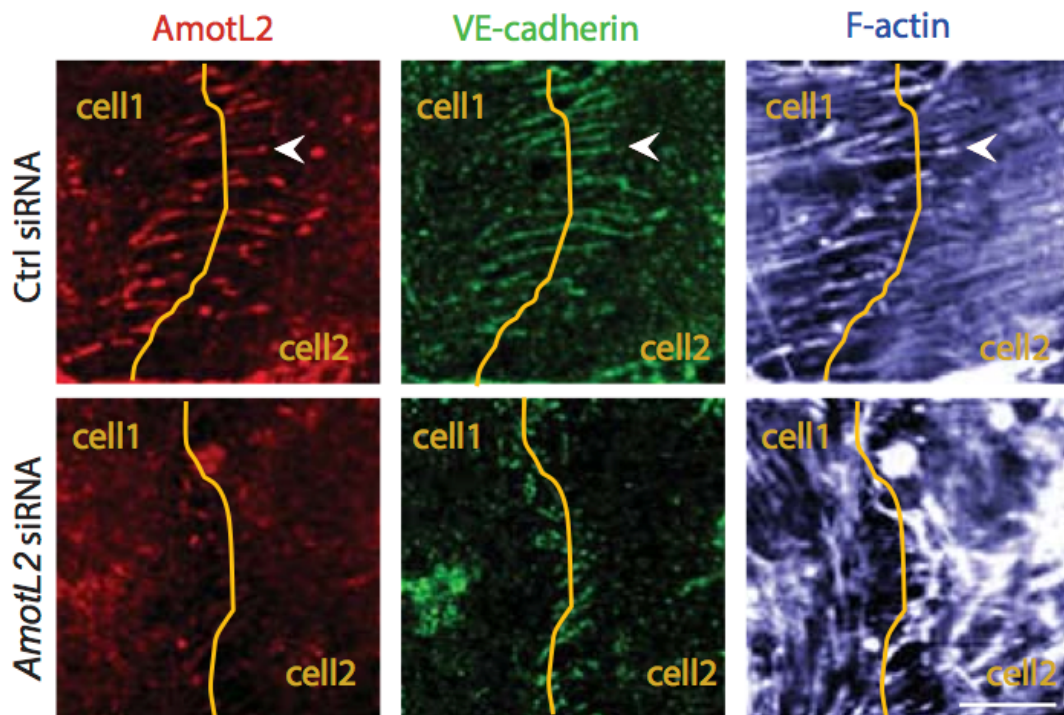


Figure IV.2 Marquage des fibres d'actines (gris) qui se lient aux jonctions adhérentes endothéliales VE-cadhérine (vert). AmotL2 (rouge) sont colocalisées avec les fibres d'actines (têtes de flèche). La ligne jaune indique l'interface cellule-cellule. Lorsque l'on perd amotL2, les VE-cadhérines sont toujours présentes au niveau des jonctions cellule-cellule, mais leur connexion aux fibres d'actines sont perdues.

en résulte que AmotL2 lie le complexe VE-cadhérine/caténine aux filaments d'actines qui sont couplés perpendiculairement aux jonctions cellulaires. En effet, dans les cellules déficientes en AmotL2 la connexion entre les fibres d'actines et les jonctions est perdue (Figure IV. 2).

Des études récentes ont montré que les complexes protéiques de cadhérines sont des sites où s'opère la mécanotransduction (Patrie et al, 2005). Or puisque la protéine AmotL2 semble requise pour la formation de la lumière aortique et qu'elle est impliquée dans la liaison cadhérine-fibres de stress, la question de savoir si AmotL2 intègre les forces contractiles de l'actomyosine pour les

transmettre aux jonctions VE-cadhérines vient tout naturellement. Afin de répondre, l'utilisation de la blebistatine est utilisée permettant ainsi l'inhibition de la contractilité de l'actine via la myosine. On remarque que in vivo et in vitro ce traitement affecte non seulement la morphologie des cellules mais cause également l'arrêt de la circulation sanguine. Par conséquent la contractilité actomyosine apparaît essentielle pour le maintien de l'expansion de la lumière aortique.

L'effet surprenant de la délétion de la protéine AmotL2 dans l'organisation des filaments d'actines (Figure IV.2), suggérant un rôle de celle-ci dans la médiation des forces mécaniques sur les adhésions cellulaires, la microscopie à traction de forces a donc été utilisée afin de mesurer les tensions intercellulaires au sein des cellules endothéliales sur lesquelles j'ai travaillé ; la force intercellulaire étant indirectement calculée via la mesures des forces cellules/substrat. Pour ces mesures j'ai donc utilisé deux phénotypes différents: un type sauvage (WT) et un type déficient en protéines AmotL2 en utilisant la technique de siARN¹¹. Ainsi nous avons pu calculer les forces en jeu dépendantes de la protéine AmotL2. Nous avons observé qu'en l'absence de cette protéine, les forces intercellulaires sont bien inférieurs à celles exercées par le WT (Figure IV.3).

Ces mesures nous permettent de conclure que la protéine AmotL2 est requise pour le maintien des forces intercellulaires qui sont exercées perpendiculairement aux jonctions cellulaires et que la formation de la lumière aortique dépend des forces exercées via le complexe VE-cadhérine/AmotL2 (Figure IV.4).

¹¹ Petits ARN pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messagers et ainsi empêcher l'expression de gènes en clivant cet ARN.

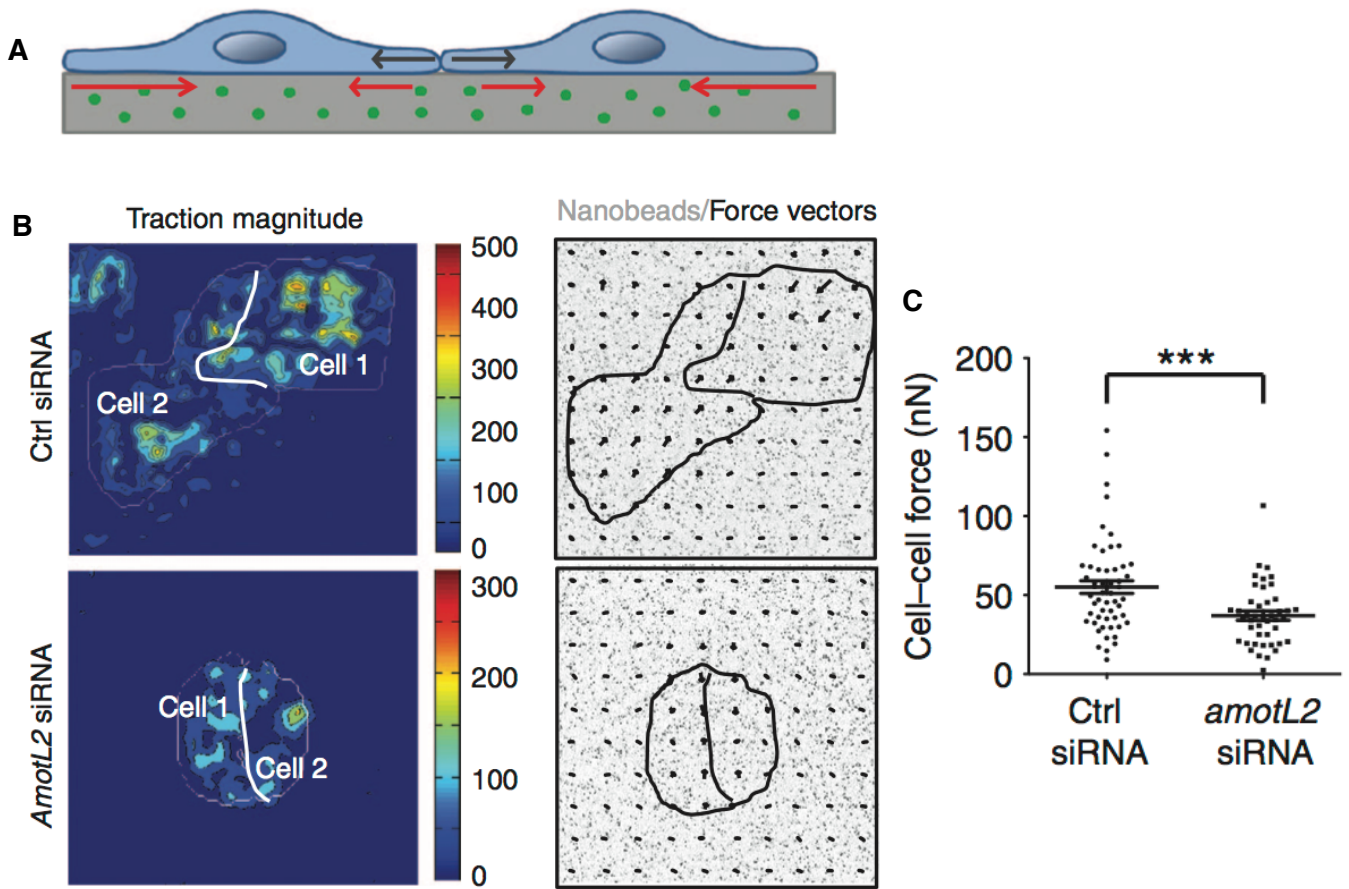


Figure IV.3 A) Illustration de la TFM sur deux cellules. Les doublets de cellules MS1 adhèrent sur un hydrogel de PAA de 5kPa contenant des billes fluorescentes (vert) et induisent un déplacement des billes permettant de calculer les forces de traction (flèches rouges) mais également de remonter aux forces intercellulaires (flèches noires). B) Carte des forces de traction (gauche) et carte du champ de force (droite) pour un doublet de cellules. La ligne blanche indique la jonction cellule-cellule où sont calculées les forces. C) La perte de la protéine AmotL2 induit une baisse de la force intercellulaire.

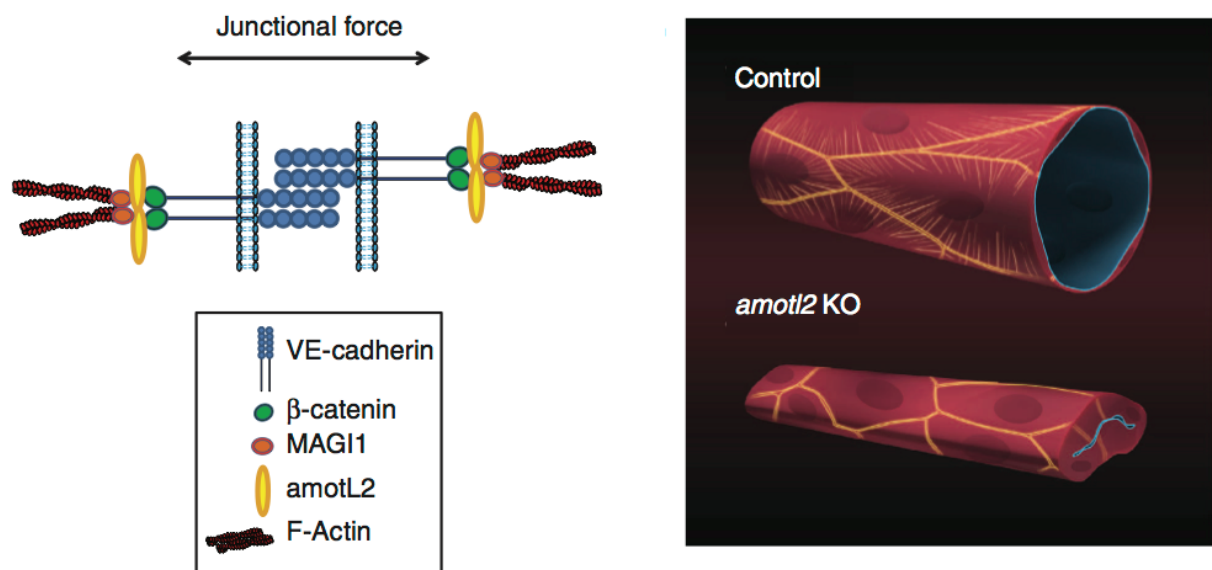


Figure IV.4 Modèle proposé pour la fonction du complexe VE-cadhérine/AmotL2 durant la formation de la lumière aortique. A) AmotL2 est requise pour la connection du complexe VE-cadhérine/caténine aux filaments d'actines et pour la transmission des forces intercellulaires. B) La perte de AmotL2 perturbe l'expansion de la lumière ou induit un collapsus de l'aorte dorsale. L'aorte dorsale est composée de cellules endothéliales plates et allongées qui sont connectées aux fibres d'actines (jaune). Les fibres d'actines s'insèrent dans les jonctions adhérentes (lignes jaunes) et permettent la transmission de forces mécaniques.

Dans le chapitre suivant nous allons voir quel est le processus de formation des proplaquettes dans le cas du Syndrome MYH9 conduisant à un dysfonctionnement de leur fonction réparatrice au sein des vaisseaux sanguins.

Article 1

ARTICLE

Received 17 Jan 2014 | Accepted 27 Mar 2014 | Published 7 May 2014

DOI: 10.1038/ncomms4743

AmotL2 links VE-cadherin to contractile actin fibres necessary for aortic lumen expansion

Sara Hultin¹, Yujuan Zheng¹, Mahdi Mojallal¹, Simona Vertuani¹, Christian Gentili¹, Martial Balland², Rachel Milloud², Heinz-Georg Belting³, Markus Affolter³, Christian S.M. Helker⁴, Ralf H. Adams⁵, Wiebke Herzog^{4,5,6}, Per Uhlen⁷, Arindam Majumdar^{1,*} & Lars Holmgren^{1,*}

The assembly of individual endothelial cells into multicellular tubes is a complex morphogenetic event in vascular development. Extracellular matrix cues and cell-cell junctional communication are fundamental to tube formation. Together they determine the shape of endothelial cells and the tubular structures that they ultimately form. Little is known regarding how mechanical signals are transmitted between cells to control cell shape changes during morphogenesis. Here we provide evidence that the scaffold protein amotL2 is needed for aortic vessel lumen expansion. Using gene inactivation strategies in zebrafish, mouse and endothelial cell culture systems, we show that amotL2 associates to the VE-cadherin adhesion complex where it couples adherens junctions to contractile actin fibres. Inactivation of amotL2 dissociates VE-cadherin from cytoskeletal tensile forces that affect endothelial cell shape. We propose that the VE-cadherin/amotL2 complex is responsible for transmitting mechanical force between endothelial cells for the coordination of cellular morphogenesis consistent with aortic lumen expansion and function.

¹ Department of Oncology and Pathology, Cancer Center Karolinska, Karolinska University Hospital, 171 76 Stockholm, Sweden. ² Laboratoire interdisciplinaire de Physique, Université Joseph Fourier (Grenoble 1), Domaine Universitaire, Bat. E45 140, rue de la physique, Saint Martin d'Hères Cedex 9 38402 Grenoble, France. ³ Abt. Zellbiologie, Biozentrum/Uni Basel, Klingelbergstrasse 70, CH 4056 Basel, Switzerland. ⁴ Biological Faculty, University of Muenster, 48149 Muenster, Germany. ⁵ Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, 48149 Muenster, Germany. ⁶ Cluster of Excellence EXC 1003, Cells in Motion, CiM -, 48149 Münster, Germany. ⁷ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, 171 77 Stockholm, Sweden. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.H. (email: lars.holmgren@ki.se).

The genesis of biological tubes is central to the physiology of glandular organs and the vascular circulatory network. In vertebrates, the primary axial blood vessels, the dorsal aorta (DA) and cardinal vein, are formed through vasculogenesis. During this process, individual mesodermal angioblasts migrate to the embryonic midline and differentiate into endothelial cells. Upon reaching their destination, endothelial cells elongate to form parallel cords followed by the formation of a central lumen allowing for the initiation of circulation^{1–4}.

Recent investigations have shed light on the molecular mechanisms of aortic lumen formation (reviewed in refs 3,5,6). Model systems recreating endothelial tubulogenesis *in vitro* have identified the cytoskeleton, apical–basal polarity as well as cell–cell adhesion components as being crucial for lumenization of tubes⁷. This has been further emphasized by studies of aortic lumen formation by genetic inactivation in mouse where modulators of the cytoskeleton (RASIP1), polarity (betal integrin and Par3) and cell–cell adhesions (VE-cadherin) all show luminal defects of the DA^{8–11}. Aortic lumen expansion is synchronized with the onset of cardiac function, which suggests a tight coordination of these signalling pathways with flow-induced morphological changes of endothelial cells during vascular development.

The *de novo* development of blood vessels in response to morphogenic gradients of growth factors such as VEGF has been extensively studied (reviewed in refs 1,12–15). Less is known about how endothelial cells perceive and transmit mechanical forces that modulate vessel shape and function. Extracellular forces are detected by endothelial cells via integrins in focal adhesions that form contact points that transfer tension from the extracellular matrix to the cytoskeleton¹⁶. Recent evidence has also shown that actomyosin contractility may be transmitted via adherens junctions¹⁷. Exogenous forces applied to cadherin have indicated a mechanical coupling between the cytoplasmic domains of cadherin and the actin cytoskeleton. Furthermore, *in vitro* measurements of force transmission have revealed that cell–cell contact-forming cells sustain endogenous forces that are directed towards the cell junctions^{18–20}.

VE-cadherin is a major component of endothelial adherens junctions. It regulates several aspects of endothelial biology including vascular integrity, permeability and blood vessel morphogenesis²¹. During embryonic vasculogenesis, VE-cadherin is essential for lumenization, and loss of VE-cadherin function resulted in endothelial apical–basal polarity and cytoskeletal defects^{2,8,22,23}. VE-cadherin regulates the actin network since dynamic remodelling of adherens junctions is closely associated with the appearance of contractile actin fibres²⁴. The actin-binding protein α -catenin is considered to be a dedicated mediator between cadherin and the actin cytoskeleton. However, this idea has been revised in favour of a more dynamic model where the α -catenin switch regulates a balance of linear versus branched actin cables depending on its association with ancillary proteins²⁵. Although recent evidence indicates that VE-cadherin play an important role in force transmission, the molecular connection to the actin cytoskeleton remains obscure²⁶.

AmotL2 belongs to the Angiomotin (amot) family of membrane-associated scaffold proteins and contains an amino-terminal glutamine-rich domain coiled-coil repeats and a carboxy-terminal PDZ-binding domain, which together structurally define the Amot family²⁷. Functional analyses of Amot and amotL1 in mouse and zebrafish have demonstrated specific roles in polarity in angiogenic tip cell migration and endothelial cell junction stability, respectively^{28–30}. Amot coordinates cell migration and cellular shape by coupling RhoA activity to the leading edge and thereby affecting formation of actin fibres³¹.

In this report, we have addressed how endothelial cells integrate mechanical forces via adherens junctions during the formation of the aortic lumen. We present data suggesting that the amotL2/VE-cadherin junctional complex is part of machinery translating junctional signals to actin cytoskeleton-driven cell shape changes, which are essential for aortic lumen expansion.

Results

AmotL2 expression in zebrafish endothelial cells. The zebrafish has emerged as an important model system to analyse the complex development of the primary vessels, the DA and the posterior cardinal vein (PCV) and the expansion of the vascular network by angiogenic sprouting. In zebrafish, *amotl2* is duplicated with paralogues on chromosomes 6 (*amotl2a*) and 2 (*amotl2b*) (Supplementary Fig. 1a). Endothelial expression of *amotl2a* and *2b* was detected by quantitative PCR in fluorescence-activated cell sorting *Tg(fli1a:EGFP)*¹ cells from transgenic embryos where EGFP expression is driven by the *fli1a* endothelial specific promoter (Supplementary Fig. 1b). In addition, the *amotl2a* gene has previously been shown to be expressed in the DA, PCV and intersegmental vessels (ISVs)³².

AmotL2a is required for DA lumen formation. In order to determine whether *amotl2* is required for vascular development, we individually targeted *amotl2a* and *amotl2b* functions in zebrafish using paralogue-specific morpholinos (MO). The effects on the vascular system were monitored using double transgenic embryos, where erythrocytes express dsRed (*Tg(gata1:dsRed)*^{sd2}) and the vascular endothelial network is visualized via EGFP (*Tg(kdr:EGFP)*^{sd43}). In agreement with the earlier results, we found that *amotl2a* depletion resulted in embryos with gastrulation defects³². However, at lower morpholino concentrations, *amotl2a* MO-injected embryos went through gastrulation properly, but exhibited pericardial oedema starting at 28 h post fertilization (h.p.f.) (Fig. 1a). Knockdown of *amotl2b* with morpholinos also resulted in pericardial oedema, but did not affect gastrulation (Fig. 1a). Confocal imaging of *amotl2a* and *amotl2b* morphant embryos revealed the establishment of both the major axial vessels, PCV and DA, as well as sprouting of ISVs and cranial vessels (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 2a). However, in morphant embryos, dsRed-positive erythrocytes accumulated in the areas of pericardial oedema whereas no circulating cells in the trunk vasculature could be detected (Fig. 1a,b, Supplementary videos 1,2). Simultaneous knockdown of *amotl2a* and *2b* paralogues, hereafter referred to as *amotl2* MO, phenocopied the individual morphant phenotypes (Fig. 1a,b). Morpholino knockdown efficiency, phenotypic reproducibility and specificity were confirmed in control experiments (Fig. 1c–e, Supplementary Fig. 1c,d,e).

In both the individual *amotl2a* and *amotl2b* knockdown embryos, and especially in the *amotl2* MO double morphants, constrictions within the DA were observed (Fig. 2a). Lumen narrowing was invariably found along the length of the DA, but never in the PCV (95% aortic origin, 0% vein, 5% unknown, $n = 62$) (Fig. 2a). DA lumen defects were not a secondary defect to the loss of blood circulation based on two observations. First, *amotl2* morphants retained rhythmic heartbeat (Supplementary videos 3, 4). Second, dorsal aortic lumen defects were not observed in *silent heart* *tnnt2* morphants, which lack heartbeat and vascular flow (Supplementary Fig. 3a)³³. Accordingly, both *amotl2a* and *amotl2b* were required for proper DA morphogenesis.

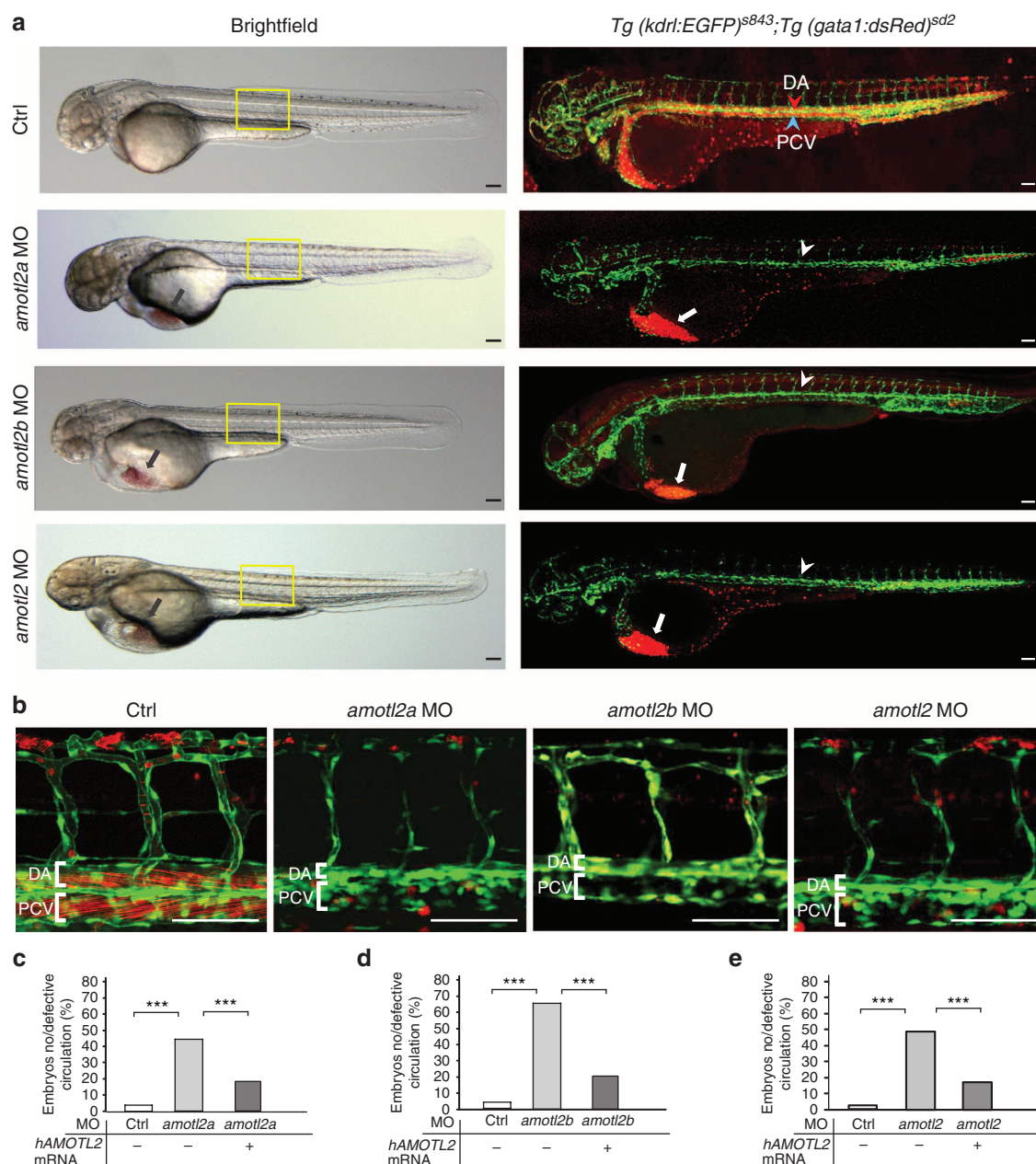


Figure 1 | Amotl2 depletion affects zebrafish circulation. (a) Brightfield (left) and fluorescent images (right) of 48 h.p.f. double transgenic embryos where red blood cells express dsRed ($Tg(gata1:dsRed)^{sd2}$) and endothelial cells are visualized by EGFP ($Tg(kdrl:EGFP)^{s843}$); control, *amotl2a*, *amotl2b*, and *amotl2a/b* (hereafter referred to as *amotl2* MO) injected embryos (morphants). *amotl2* morphants show loss of trunk circulation (arrowhead) and peri-yolk oedema (arrow), even though they have beating hearts. DA and PCV are marked with red and blue arrowheads, respectively (top panel). Scale bar, 100 μ m. (b) Magnified images (yellow box in a) show loss of dsRed-positive erythrocytes in the morphant ISVs and DA. DA morphogenesis is affected in *amotl2* morphants, while the PCV is unaffected (brackets indicate vessel diameter). At 48 h.p.f., both the ISVs and dorsal anastomosing vessel were present, but lacked patent lumens. The lack of visible lumens in ISVs is due to the absence of blood flow in the aorta. Scale bar, 50 μ m. (c–e) Rescue of *amotl2a* (c), *amotl2b* (d) and *amotl2* MO (e) defects by co-injection with full-length wild-type human *amotl2* p100 mRNA demonstrating that the circulatory defects are specifically caused by loss of *amotl2* function. $n \geq 60$ embryos per group, *** $P \leq 0.001$ as calculated by the χ^2 test.

Amotl2 is required for endothelial elongation. The aortic lumen defects in *amotl2* MO may have been caused by defective cell proliferation, cell morphogenesis or polarity. Cell counts showed no difference between the control and morphant aortic endothelium. We turned our attention to endothelial cell shape during aortic tube formation. By injecting a *fli1a:mCherry* containing plasmid into $Tg(fli1a:EGFP)$ zebrafish embryos, individual aortic endothelial cells were mosaically labelled with mCherry. In zebrafish, aortic endothelia have a flattened

and elongated morphology (Fig. 3a)³⁴. The dimensions of individual mCherry-positive DA endothelial cells were quantified by calculating the length to width and the length to height ratios (bidirectional arrows, Fig. 3a). Quantification of these morphometric ratios showed a significant defect in anteroposterior elongation in *amotl2*-depleted embryos (Fig. 3b,c). These morphological changes could be restored by co-injection with human *AMOTL2* messenger RNA (mRNA) (Fig. 3a,b,c).

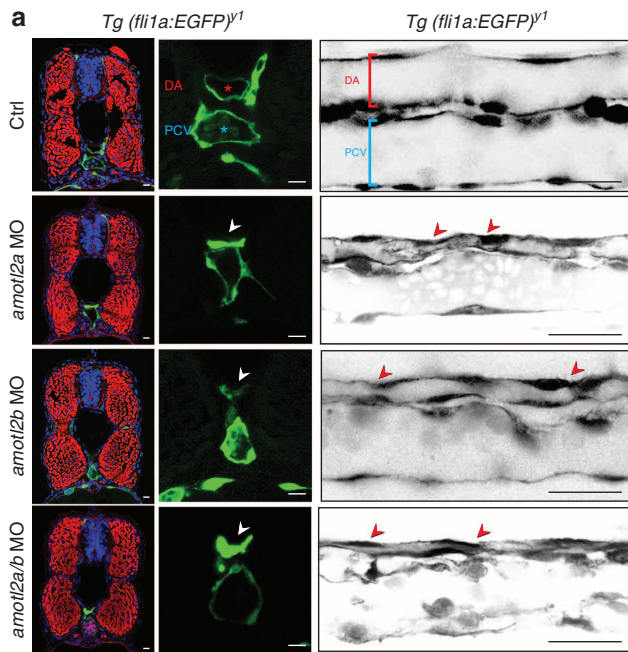


Figure 2 | DA lumen constrictions in *amotL2* MO morphants. (a)

Transverse sections (left, thickness 200 μm) from 48 h.p.f. *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* fish stained with phalloidin (red) to image F-actin and TO-PRO-3 iodide (blue) to label nuclei. In close up (mid panel), control embryos show a patent DA lumen (red asterisk) and a patent PCV lumen (blue asterisk). Scale bar, 10 μm . Luminal DA constrictions are present in *amotL2a*, *amotL2b* and *amotL2* MO morphants (arrowheads). The appearance of a midline aorta in *amotL2* MO indicated that midline directed migration was unaffected. Sagittal views (right) of the DA (red brackets show vessel diameter) and PCV (blue brackets show vessel diameter) in control and *amotL2* morphants. *amotL2* morphants show DA constrictions (red arrowheads) and reduced DA diameter. Scale bar, 50 μm .

AmotL2 regulates cytoskeletal organization. Next, we assessed whether the observed deficiency in endothelial cell elongation was due to perturbations in cytoskeletal architecture. In order to study actin reorganization in real time, we used a transgenic fish expressing Lifeact (a 17-amino-acid peptide that binds to filamentous actin) fused to green fluorescent protein (GFP)³⁵. Vascular-specific expression of Lifeact-GFP was directed by the VE-cadherin promoter. In control fish, Lifeact signal was mainly localized to cortical junctional actin, as well as to radial actin fibres connecting perpendicularly to endothelial junctions (Fig. 3d). Of particular interest, in *amotL2* morphant Lifeact fish, these fibres were disrupted and positive signals were detected in intracellular punctae instead (Fig. 3d). Lifeact signals associated with cortical actin were not detectably affected in *amotL2* morphants (Fig. 3d). The actin fibre network could be restored by reintroduction of human *amotL2* mRNA (Fig. 3d). A similar actin filament defect was observed by phalloidin immunofluorescence staining of zebrafish embryos. (Supplementary Fig. 2b,c). Parallel analysis of *tnnt2* morphants showed that endothelial cells maintained the cellular shape and the actin filament network also in the absence of circulation (Supplementary Fig. 3b–e). We therefore concluded that the *amotL2* effect on endothelial morphogenesis was not an indirect effect of perturbed axial circulation.

We went on to assess whether the observed cytoskeletal phenotype was associated with defects in mislocalization of junctional proteins. VE-cadherin localization was analysed in live VE-cadherin-EGFP transgenic fish as well as by whole mount

immunostaining using VE-cadherin-specific antibodies (Fig. 3e and Supplementary Fig. 4a). Both approaches showed junction localization of VE-cadherin even with the altered morphology of the *amotL2* morphant aortic endothelial cells. This was also the case with the ZO1 tight junction marker (Supplementary Fig. 4b).

To assess apical-basal cell polarity in morphant embryos, we also analysed the localization of apical podocalyxin and basement membrane laminin. In *amotL2* MO, podocalyxin was observed in a seam-like pattern between paired endothelial cells of the morphant aortae, suggesting that apical polarity had been established and that membrane translocation of podocalyxin was not affected (Fig. 3f). Likewise, basement membrane anti-laminin staining was unaffected (Fig. 3g). Taken together, the *in vivo* experiments indicated a specific defect in the actin filaments anchored in the cellular junctions, whereas junction formation and the establishment of apical-basal polarity appeared intact.

Inactivation of *amotL2* in mouse induces aortic constrictions.

In order to further understand the role of *amotL2*, we used a genetic deletion approach to silence gene expression during mouse embryonic blood vessel development. We first examined the expression patterns of *amotL2* *in vivo*, by western blot analysis and whole mount immunofluorescence staining of mouse embryos. A 100 kDa *amotL2* band was detected in embryonic lysates from E5 to E19 (Supplementary Fig. 5a). Laser scanning confocal microscopy revealed positive *amotL2* staining that localized to CD31-positive cellular junctions of the DAe of embryos at E8 (Fig. 4a). To inactivate the *amotL2* gene in a cell type-specific fashion, we generated mice with loxP sites flanking exon 3 (Supplementary Fig. 5b). The resulting *amotL2^{lox/lox}* mice were then mated with Cdh5(PAC)-CreERT2 transgenics. The latter allowed efficient tamoxifen-inducible conditional recombinase expression in endothelial cells³⁶. Tamoxifen-driven recombination was verified by genomic PCR analysis from embryonic and yolk sac extracts (Supplementary Fig. 5c).

At E9.5, *amotL2^{Δlox/Δlox}/Cdh5(PAC)-CreERT2* mice (from here on referred to as *amotL2^{Δlox/Δlox}*) did not differ significantly in size from Cre-negative littermates and were viable (Fig. 4b). Analysis of the vascular system of mutants at E9.5 showed that in 80% of mutant embryos, one or both aortae showed lumen defects (Fig. 5a). The activity of *amotL2* appeared to be dose dependent, as we detected aortic phenotypes in *amotL2* heterozygote embryos at similar frequencies (Fig. 5a). We also observed aortic constrictions close to the ventricular outflow tract (Supplementary Fig. 5d), whereas no defects were detected in littermates that lacked the Cre gene. The efficiency of tamoxifen injections in inducing Cre expression in the vasculature of embryos was monitored *in vivo* after mating to YFP-reporter mice (Fig. 5b). Here, YFP-positive areas (indicating *amotL2* recombination) correlated with aortic constrictions (Fig. 5b). Similar to our observations in zebrafish, endothelial cells of the aorta in *amotL2*-mutant mice exhibited a rounded cell shape (Fig. 5c). Other vascular beds such as the lumen of the PCV, ISVs and the brain vascular plexus were not seemingly affected. Furthermore, no detectable inhibition of postnatal retinal angiogenesis could be detected (Supplementary Fig. 6a,b).

amotL2 links VE-cadherin to junctional actin filaments.

In order to gain further insight into how *amotL2* might regulate actin architecture, we downregulated *amotL2* expression using small interfering RNAs (siRNAs) in cultured mammalian endothelial MS1 cells. *amotL2* was located to areas where actin fibres anchor in the VE-cadherin-positive endothelial junctions (Fig. 6a). In *amotL2* siRNA-treated MS1 cells, VE-cadherin still

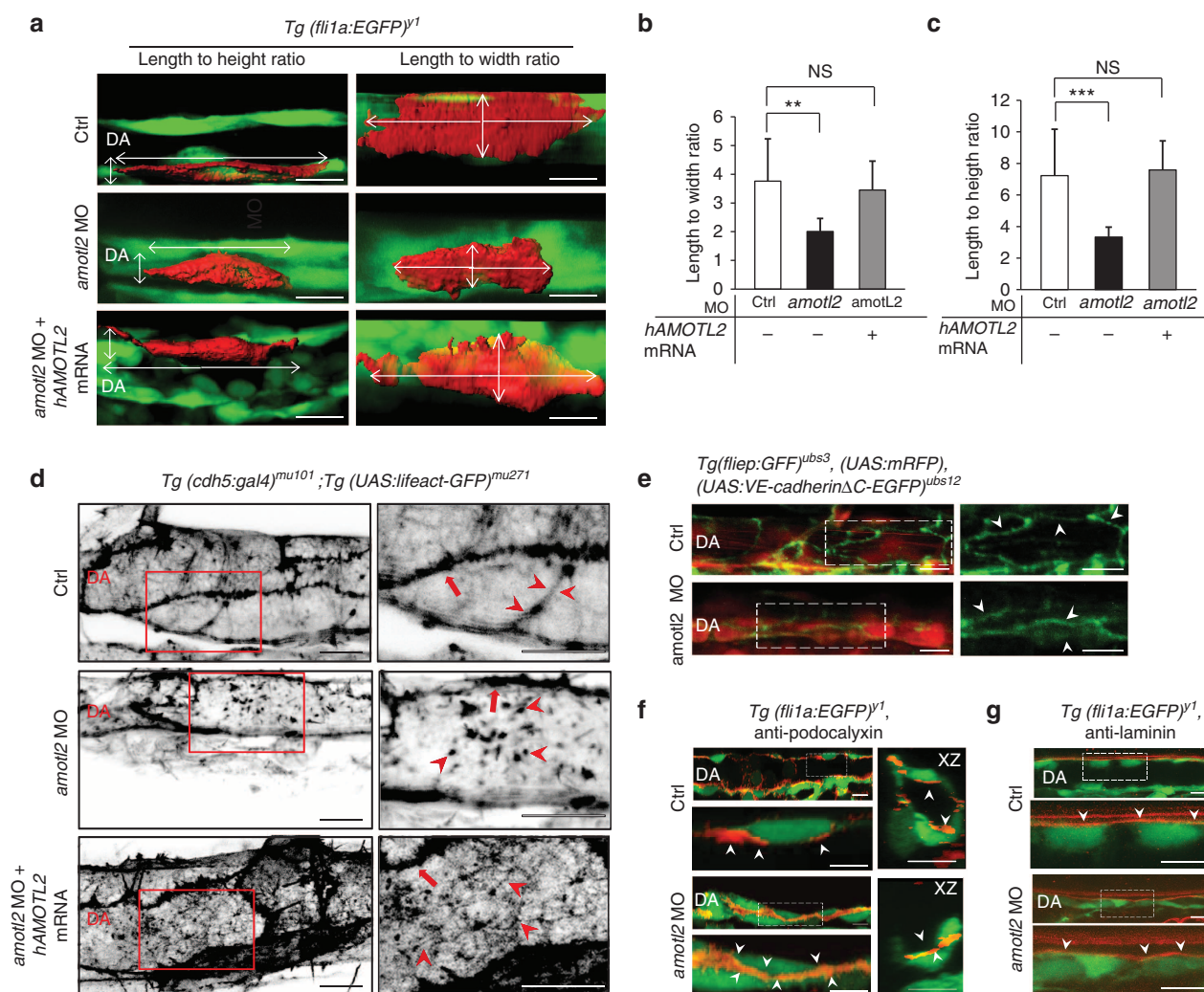


Figure 3 | Aortic endothelial cell shape and cytoskeletal defects in *amotl2* MO. (a) Sagittal (left) and dorsal (right) view of a mCherry-labelled DA endothelial cell of a 30 h.p.f. zebrafish embryo. Images show three-dimensional surface reconstruction of individual mCherry-expressing cells within the DA. Bidirectional arrows indicate the length and width dimensions. In *amotl2* MO, DA endothelial cells show altered cell shape. These morphological changes as well as the lumen defect can be reversed by injection of a human *amotl2* mRNA. Scale bar, 10 μ m. (b) Quantification of length to width ratio in individual mCherry positive, control and *amotl2* MO aortic endothelial cells, as well as *amotl2* MO cells rescued by co-injection with human *amotl2* mRNA (control $n = 18$ cells, *amotl2* MO $n = 10$ cells, *amotl2* MO + hAMOTL2 mRNA $n = 11$ cells, Ctrl versus *amotl2* MO $P = 0.011$, Ctrl versus *amotl2* MO + hAMOTL2 mRNA $P = 0.541$). (c) Quantification of length to height ratio in individual mCherry positive, control and *amotl2* MO aortic endothelial cells (Ctrl versus *amotl2* MO $P = 0.0003$, Ctrl versus *amotl2* MO + hAMOTL2 mRNA $P = 0.722$). P -values were calculated by student's t -test. Error bars indicate s.d. NS, non significant. (d) Endothelial actin cytoskeletal structure visualized in the dorsal aortic endothelia from living 48 h.p.f. *Tg(cdh5:gal4)^{mu101}; Tg(UAS:lifect-GFP)^{mu271}* transgenic fish. Red boxes indicate magnified areas (right). Arrowheads show actin filaments present in the control, and punctuate actin in the *amotl2* MO. Arrows indicate cortical actin present in both control and *amotl2* MO embryos. By introducing human *amotl2* mRNA, actin filaments could be restored (arrowheads). Scale bar 10 μ m. (e) In control *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}; (UAS:mRFP); (UAS:VE-cadherinΔC-EGFP)^{ubs12}* embryos (top), where VE-cadherin is tagged to EGFP, and endothelial cells labelled by mRFP, VE-cadherin enmarks cell-cell junctions. In *amotl2* MO embryos (bottom), VE-cadherin is still localized in between endothelia at sites of aortic constrictions. Boxed areas are magnified to the right, VE-cadherin-EGFP signal indicated with arrowheads. Scale bar 10 μ m. (f) The apical-membrane sialomucin podocalyxin (arrowheads) is retained in apical membranes of *amotl2* MO DA constrictions. Control *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* 28 h.p.f. embryos (top) and *amotl2* MO (bottom). Boxed areas are magnified below. This is also visualized in the optical transverse section (XZ, right). Scale bar, 10 μ m. (g) In control *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* 28 h.p.f. embryos (top), anti-laminin staining is basal (arrowheads) and in *amotl2* MO, anti-laminin staining is unaffected (arrowheads, bottom). Scale bar, 10 μ m.

showed junctional expression, but the connection to actin fibres was lost (Fig. 6a,b). Strikingly, *amotl2*-depleted cells did not form actin filaments that connect to the cell-cell junctions whereas cortical actin was maintained (Fig. 6a,b), consistent with the zebrafish *amotl2* MO phenotype (Fig. 3d).

The integrity of VE-cadherin-based adherens junctions is calcium dependent and can be modulated by withdrawal and subsequent re-addition of calcium³⁷. Re-addition of calcium to

calcium-depleted MS1 cells resulted in synchronous cell shape changes correlating with formation of actin filaments associated to endothelial junctions (Supplementary Fig. 7b). In contrast, knockdown of *amotl2* in MS1 cells rendered the cells refractory to calcium-induced cell shape changes (Fig. 6c). In addition, in ctrl siRNA MS1 cells, calcium re-addition caused relocalization of VE-cadherin and *amotl2* from the cytoplasm to cell junctions with similar kinetics (Supplementary Fig. 7b).

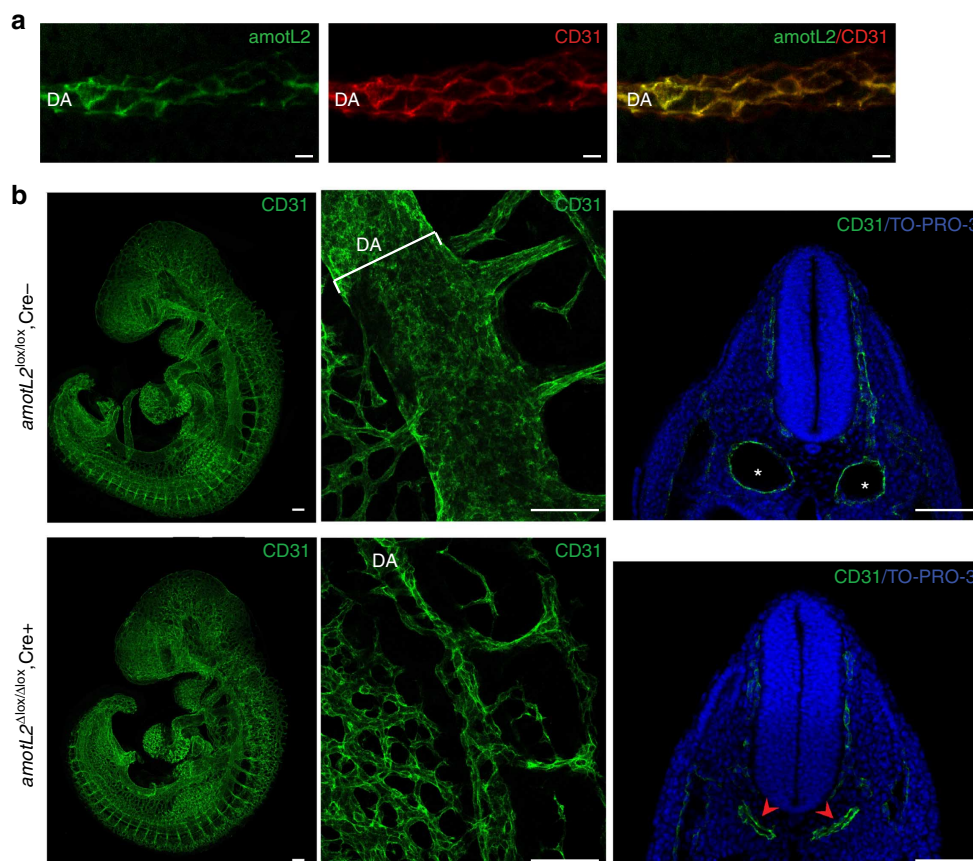


Figure 4 | Genetic deletion of *Amotl2* in mice results in aortic lumen constrictions. (a) *amotL2* immunofluorescence staining (green) was detected at cell-cell junctions in aortic endothelial cells of mouse embryos (E8), and colocalized to CD31 staining (red). Scale bar, 10 μ m. (b) CD31 staining visualized the blood vessel network of a *amotL2*^{lox/lox}, Cre⁻ embryo (E9.5). The magnified image (mid panel), showed presence of a DA lumen (bracket marks vessel diameter). The existence of lumens in the paired dorsal aortae was also apparent in the transverse vibratome section (asterisk, 150 μ m thickness, right panel). Endothelial cells were labelled with CD31 (green) and TO-PRO-3 was used to visualize nuclei (blue). In somite staged *amotL2*^{Δlox/Δlox}, Cre⁺ embryos (E9.5), the general vascular network was present, but in the magnified image (mid panel), it was evident that the lumen of the DA was constricted. This could also be observed in the transverse vibratome section (arrowhead, 150 μ m thickness, right panel). Scale bar, 100 μ m.

We and others have shown that the Amot family of proteins associates to the scaffold junctional protein MAGI1 via a WW protein interaction motif^{38,39}. It has further been reported that MAGI1 associates to VE-cadherin via binding to β -catenin^{40,41}. These findings raised the question whether *amotL2* functions together with VE-cadherin in controlling cytoskeletal architecture. Therefore, we performed co-immunoprecipitation of *amotL2* and associated proteins before and after re-addition of calcium. As shown in Fig. 6d, VE-cadherin, MAGI1, β -catenin, α -catenin and β -actin were pulled down together with *amotL2* in MS1 endothelial cells. Of interest, *amotL2* association with β -actin correlated with actin fibre formation and cell elongation (Fig. 6d).

Analysis of the *amotL2*/VE-cadherin complex. We further analysed the biochemical composition of the VE-cadherin/*amotL2* complex. To this end, we mutated the putative WW-binding motifs located in the N-terminal domain of *amotL2*, by exchanging the tyrosine to an alanine (Fig. 7a). Co-immunoprecipitation analysis showed that the LPTY but not the PPQY motif was required for the association to MAGI1 and β -actin, while neither of the sites were important for the binding to VE-cadherin or β -catenin (Fig. 7b). The importance of the LPTY site was further underscored by functional analysis in zebrafish. mRNA encoding wt, LPTA or PPQA-mutant human

amotL2 were co-injected with *amotL2* morpholinos into zebrafish embryos as described in previous sections. Mutation of the LPTY motif completely abrogated the rescue effect of the injected mRNA while the PPQA mutant rescued the circulatory phenotype to the same extent as the wild-type mRNA (Fig. 7c). As shown in Fig. 7d, MAGI1 could be co-immunoprecipitated together with *amotL2* and VE-cadherin. However, the binding of MAGI1 to VE-cadherin was lost in *amotL2* siRNA-depleted cells. These data suggested that *amotL2* coupled MAGI1 and actin fibres to the VE-cadherin junctional complex. We next used *amotL2* deletion constructs (shown in Fig. 7a) to narrow down the sequences essential for the association with VE-cadherin. Co-immunoprecipitation analysis localized the VE-cadherin and β -catenin binding site to the 101-307 a.a. of the N-terminal domain of *amotL2* (Fig. 7e).

***amotL2* mediates mechanical force at cellular junctions.** Our data showed that *amotL2* linked VE-cadherin to actin fibres that were coupled perpendicular to cellular junctions. The recent evidence that cadherin-protein complexes are sites of mechanotransduction raised the possibility that *amotL2* integrated actomyosin contractile forces, required for lumen expansion¹⁷. First, we assessed whether chemical inhibition of actin contraction using the non-muscle myosin inhibitor blebbistatin could phenocopy the effect of *amotL2* MO in zebrafish.

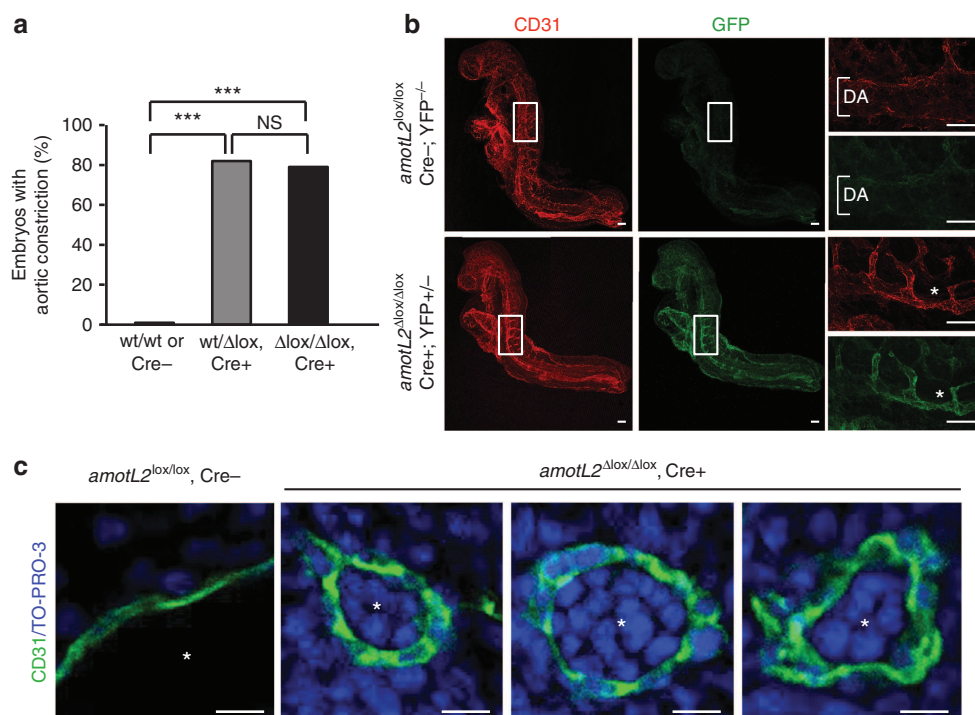


Figure 5 | *amotL2* KO induces aortic constrictions and altered endothelial cell shape. (a) Quantification of aortic defects showed presence of aortic constrictions in around 80% of both *amotL2*^{wt/ Δ lox}, Cre⁺ and *amotL2* ^{Δ lox/ Δ lox}, Cre⁺ embryos. All embryos lacking Cre-recombinase expression, as well as *amotL2*^{wt/wt}, Cre⁺ embryos were considered wt and grouped together. $n(\text{amotL2}^{\text{wt/wt}} \text{ or } \text{Cre}^-) = 10$ embryos, $n(\text{amotL2}^{\text{wt}/\Delta\text{lox}}, \text{Cre}^+) = 11$ embryos, $n(\text{amotL2}^{\Delta\text{lox}/\Delta\text{lox}}, \text{Cre}^+) = 19$ embryos). NS, non significant, P -values were calculated by the χ^2 test. (b) GFP immunofluorescence staining was performed to visualize the YFP reporter, as a marker for Cre-recombinase expression. GFP expression (green) colocalized to CD31 staining (red), in vasculature of E8.5 embryos, arguing for specific expression of GFP in cells expressing CDH5-Cre-recombinase. Constriction of the DA was observed in areas of GFP-positive endothelial cells. Boxed areas are magnified to the right. Aortas of control embryos show a patent lumen (bracket), while in *amotL2* ^{Δ lox/ Δ lox} embryos, the aorta is constricted (asterisk). Scale bar 100 μ m. (c) Magnified images from vibratome sections of an *amotL2*^{lox/lox}, Cre⁻, as well as three examples of *amotL2* ^{Δ lox/ Δ lox} Cre⁺ embryos. Images of the latter showed altered shape of aortic endothelial cells, as visualized by CD31 staining (green). Control endothelial cells showed elongated and flat morphology, compared with the short and rounded shape of the endothelial cells from the *amotL2* ^{Δ lox/ Δ lox} embryo. TO-PRO-3 was used for labelling the nuclei (blue). Asterisks indicate DA lumen. Scale bar 10 μ m.

In agreement with *amotL2* MO, blebbistatin treatment between 18–20 h.p.f. caused loss of circulation and reduced length to width and length to height ratios in mCherry-labelled dorsal aortic endothelia *in vivo* and in MS1 cells *in vitro* (Fig. 8a–d, Supplementary Fig. 8a,e,f). Furthermore, actomyosin contractility appeared essential for the maintenance of lumen expansion, as treatment of embryos after initiation of axial vessel circulation induced collapse of the DA (Supplementary Fig. 8d). Taken together, these data supported the notion that contractile mechanical forces were required for aortic luminal expansion.

The striking effect of *amotL2* depletion on the junctional actin filament organization suggested a role in mediating the mechanical load on cellular adhesions. To test this hypothesis, we employed traction force microscopy to measure tension between pairs of endothelial cells. This method has been described by Gardel and coworkers¹⁹ and the junctional force is indirectly calculated by measuring forces exerted on the extracellular matrix⁴². Control or *amotL2* siRNA-depleted MS1 cells were plated on fibronectin, which had been chemically cross-linked to polyacrylamide gels. Forces applied on the cell–extracellular matrix interface were quantified by measuring the displacement of fluorescent beads before and after removal of cells by trypsinization. The force transmitted between doublets of cells was determined using a calculation of the imbalance of traction forces exerted on the focal adhesions (Fig. 8e,f)¹⁹. The net force exercised on the junctions was significantly lower in the *amotL2*-depleted cells (Fig. 8f,i). In addition, in control cells,

forces were directed perpendicular to the cell junctions, whereas the directional force was lost in the *amotL2* siRNA-treated cells (Fig. 8g,h). A schematic is shown in Fig. 9a showing how force is transmitted via endothelial adherent junctions through the VE-cadherin/*amotL2* complex leading to the expansion of the aortic lumen (Fig. 9b).

Discussion

A major issue in the vascular development is how individual endothelial cells collectively unite in the formation of tubes. How do endothelia interpret, integrate and translate multiple cues into defined, reproducible cytoskeletal architectures and multicellular organization structures? In this report, we provide mechanistic insight into how mechanical force via cell–cell adhesions and the cytoskeletal network coordinate aortic lumen expansion. This process involves the protein *amotL2* that links the generation of VE-cadherin-associated contractile actin filaments to cell and tissue morphogenesis.

Endothelial cells elongate in the anterior–posterior axis during aorta formation. In our studies, we could show that this cellular shape change was not dependent on the shear stress exerted by blood flow. Instead, we propose that endothelial morphogenesis during aortic lumen formation is dependent on the tensile forces exerted via the VE-cadherin/*amotL2* junctional complex. This notion was supported by our findings that short-term treatment with the myosin inhibitor blebbistatin mimicked the effects of

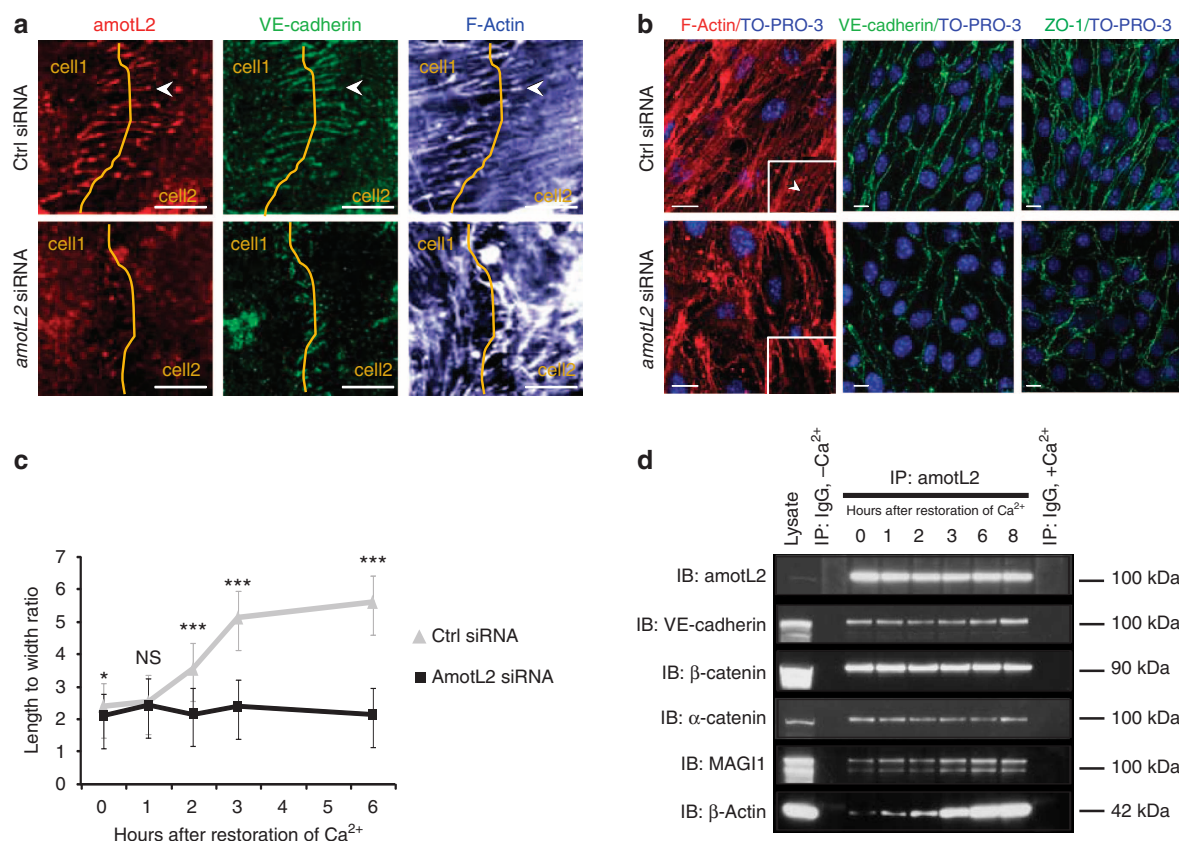


Figure 6 | AmotL2 is associated with the VE-cadherin-protein complex. (a) Phalloidin staining visualized axial actin fibres (grey) that insert into the anti-VE-cadherin-positive endothelial adherens junctions (green). amotL2 (red) colocalized with actin fibres where they insert into the junction between the apposed endothelial surfaces (arrowheads). Yellow line indicates the cell-cell interface. When amotL2 levels were depleted by siRNA, VE-cadherin was still present at cell-cell junctions, but its connection to actin fibres were lost. (b) In MileSven1 pancreatic islet endothelial (MS1) cells, F-actin fibres were visualized with phalloidin staining (red) (magnified in box to the lower right, arrowhead). Actin fibres were absent in *amotL2* siRNA-treated cells, but cortical actin belts were still present. The adherens and tight junction-associated proteins, VE-cadherin and ZO-1 (green) were still present at cell-cell contacts in *amotL2* siRNA-treated MS1 cells. Scale bar, 10 μ m. (c) Calcium switch time course experiment showing that reformation of VE-cadherin-based adherens junctions with calcium induces cell elongation as measured by progressively increasing length to width ratio in control siRNA-treated MS1 cells. *amotL2* siRNA-treated MS1 cells did not elongate even after re-addition of calcium. $n > 45$ cells per group. $P(0h) = 0.017$, $P(1h) = 0.494$, $P(2h) = 1.443 \times 10^{-13}$, $P(3h) = 1.306 \times 10^{-25}$, $P(6h) = 1.694 \times 10^{-34}$. P -values were calculated by the student's t -test. Error bars indicate s.d. NS, nonsignificant. (d) Co-immunoprecipitation of amotL2 followed by western blot analysis at different time points after re-addition of Ca²⁺. The association of the VE-cadherin/catenin complex to amotL2 was independent of calcium levels. On the contrary, MAGI1 and β -Actin only associated to the VE-cadherin/catenin/amotL2 complex after restoration of calcium levels.

amotL2 depletion. In addition, we could show that amotL2 was essential for the transmission of junctional force between endothelial cells *in vitro*. This finding is significant, as it shows how amotL2 enables the formation of transcellular actin cables that share mechanical actin and tension in between cells. Further, this allows lumen expansion to become a collective event that is needed for the synchronization with the onset of circulation.

It was apparent that amotL2 inactivation specifically affected aortic function, whereas the vein lumen formation appeared to be intact. The mechanisms of how these two tubular structures are formed may provide an explanation for this. Similar to epithelial lumen formation *in vitro*, the aortic lumen is generated between adjacent endothelial cells by establishment of apical-basal polarity and the subsequent repulsion and expansion requires accumulation of fluid pressure and actin contraction. There are other principles described for the development of large calibre vessels such as the common cardinal vein. Here, lumen is formed by ensheathment of preexisting luminal space³⁵. Inherent differences in the mechanisms of lumen formation may therefore explain why amotL2 is essential for aortic and not vein lumen

formation. We did notice a slight delay in ISV formation in *amotL2* MO embryos; however, no detectable difference was observed compared with control embryos at 48 h.p.f. Furthermore, inactivation of *amotL2* during postnatal retinal angiogenesis did not affect endothelial cell migration. An indirect effect on ISV formation, due to defects in the DA, may therefore explain the apparent discrepancies between our data and what has previously been reported⁴³.

VE-cadherin has previously been shown to be essential for multiple biological processes that influence endothelial cells, such as proliferation, migration, permeability and polarity⁴⁴. Our data show that amotL2 is a downstream effector of VE-cadherin controlling cell elongation and junctional force. We propose a model, whereby amotL2 integrates VE-cadherin junctional signalling to endothelial actin fibre assembly during DA lumen expansion (Fig. 9). This may occur in conjunction with other cellular mechanisms for lumen expansion, like electrostatic repulsion and vectorial fluid transport^{45,46}. Taken together, we have identified a novel mechanism by which force can be transmitted across cells via adherens junctions and actin fibres. Further studies may show whether the connection between

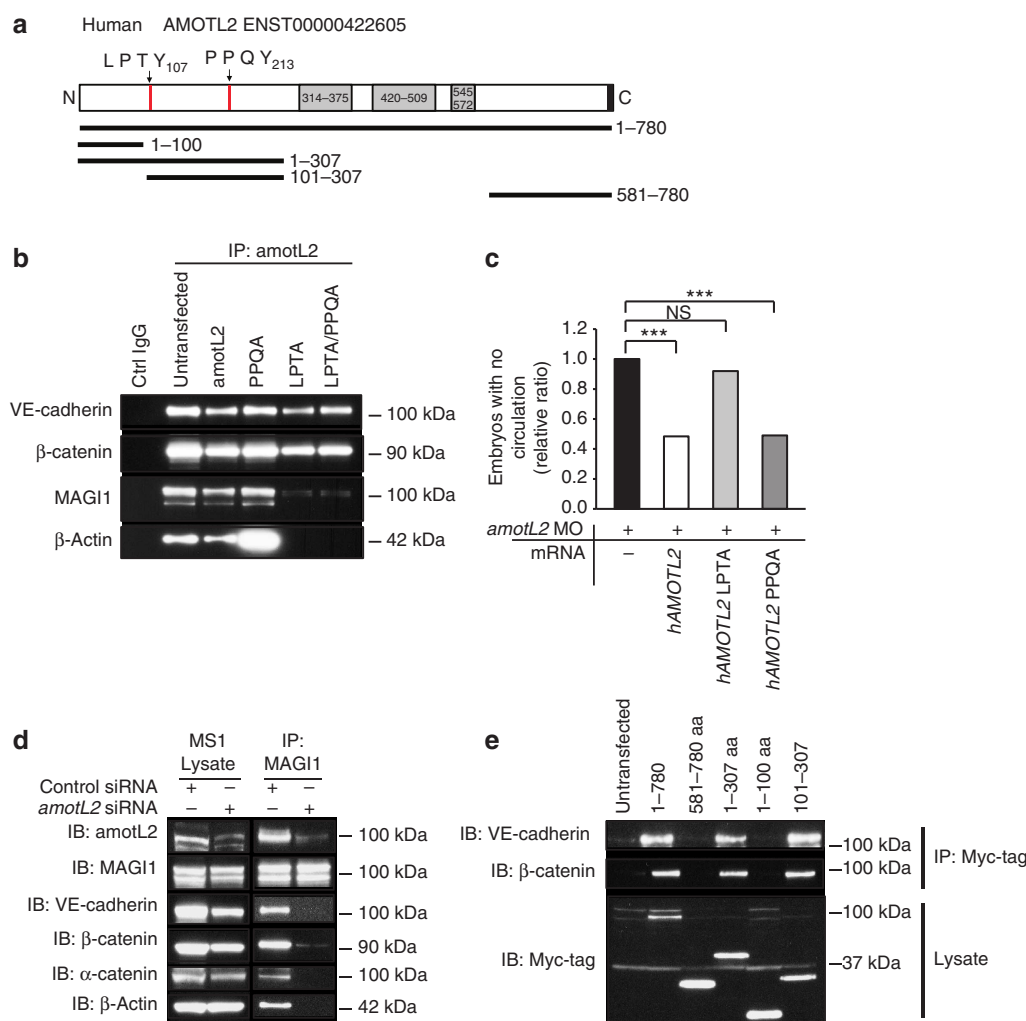


Figure 7 | AmotL2 association with VE-cadherin controls actin fibre formation *in vitro*. (a) Schematic model showing the different domains of the human amotL2 protein (ensembl accession code ENST00000422605). Putative coil-coil domains (314–375, 420–509, 545–572), carboxy-terminal PDZ-binding motif and the amino-terminal LPTY (107) and PPQY (213) WW-binding sites. In addition, the different amotL2 deletion constructs used are shown. (b) Endogenous amotL2, as well as the wild-type construct co-immunoprecipitates with VE-cadherin, β -catenin, α -catenin, MAGI1 and β -Actin and in MS1 cells. Mutation of the PPQY motif did not affect the binding to the VE-cadherin adherens junction complex. When the LPTY motif was mutated to LPTA, the binding of amotL2 to MAGI1 and β -Actin was lost. The double mutant (LPTA/PPQA) showed a binding efficiency similar to the LPTA mutation alone. (c) The amotL2 MO circulatory phenotype in 48 h.p.f. zebrafish embryos could be rescued by injection of the wild-type human amotL2 mRNA, and the mRNA with a mutation in the PPQY motif. The LPTA-mutant mRNA did not restore circulation. $n(\text{amotL2 MO}) = 215$ embryos, $n(\text{amotL2 MO} + \text{hamotL2 mRNA}) = 193$ embryos, $n(\text{amotL2 MO} + \text{hamotL2 LPTA mRNA}) = 84$ embryos, $n(\text{amotL2 MO} + \text{hamotL2 PPQY mRNA}) = 181$ embryos. NS, nonsignificant. P -values were calculated by the χ^2 test. (d) When immunoprecipitation was performed after silencing of amotL2 expression by siRNA, MAGI1 association to the VE-cadherin/catenin protein complex was abrogated. In addition, the binding of MAGI1 to β -Actin was lost. (e) Full-length amotL2-Myc (1–780 aa) or the indicated Myc-tagged amotL2 deletion constructs were transfected into MS1 cells. amotL2 was immunoprecipitated from cell lysates using anti-Myc antibody. Only constructs containing the 101–307 aa domain was able to interact with VE-cadherin and β -catenin.

amotL2, adherens junctions, and the actin network is a unifying principle in lumen formation in tubular epithelial and ductal organs.

Methods

Mouse experiments. Animal experiments were performed according to a permit from the Stockholm South ethical committee in Sweden. The amotL2 conditional knockout mice were crossed with Cdh5(PAC)–CreERT2 as well as ROSA26–EYFP reporter mice. All the animals were in C57BL/6 background. Mouse tail tips, yolk sacs or embryos were used for genotyping. The primers used in genomic PCR are as follows:

for amotL2 flox gene: 5'-CTAGGAGCACGTGGAAGACC-3' (forward)
5'-GGGCTAGCTGCTCTACAAGG-3' (reversed);
for amotL2 deflox gene: 5'-CAGGAGGATCACACCACAG-3' (forward)
5'-CAGCAAG TGGAAAGCCTGAG-3' (reversed).

To investigate the function of amotL2 during mouse embryonic development, tamoxifen was intraperitoneally injected into pregnant amotL2^{lox/lox}/Cdh5(PAC)–CreERT2/ROSA26–EYFP mice from E5.5 to E8.5. The dose of tamoxifen was 0.5 mg for E5.5 and 1.0 mg per day for the remaining 3 days. Embryos were collected at E9.5 and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA).

To analyse the function of amotL2 during postnatal retina angiogenesis, intragastric injection with tamoxifen (50 μ g per day from P1 to P3) was performed on amotL2^{lox/lox}/Cdh5(PAC)–CreERT2/ROSA26–EYFP male and female pups⁴⁷. Mouse retinas were dissected at P6 and fixed with PFA for immunostaining.

Zebrafish. Zebrafish were raised and maintained according to the standard protocols and in accordance with the regulations set out by the Swedish Board of Agriculture for the use of laboratory animals in scientific research. The following transgenic lines were used in this study:

Tg(kdr:EGFP)⁸⁴³ (ref. 34);
Tg(gata1:dsRed)^{sd2} (ref. 48);

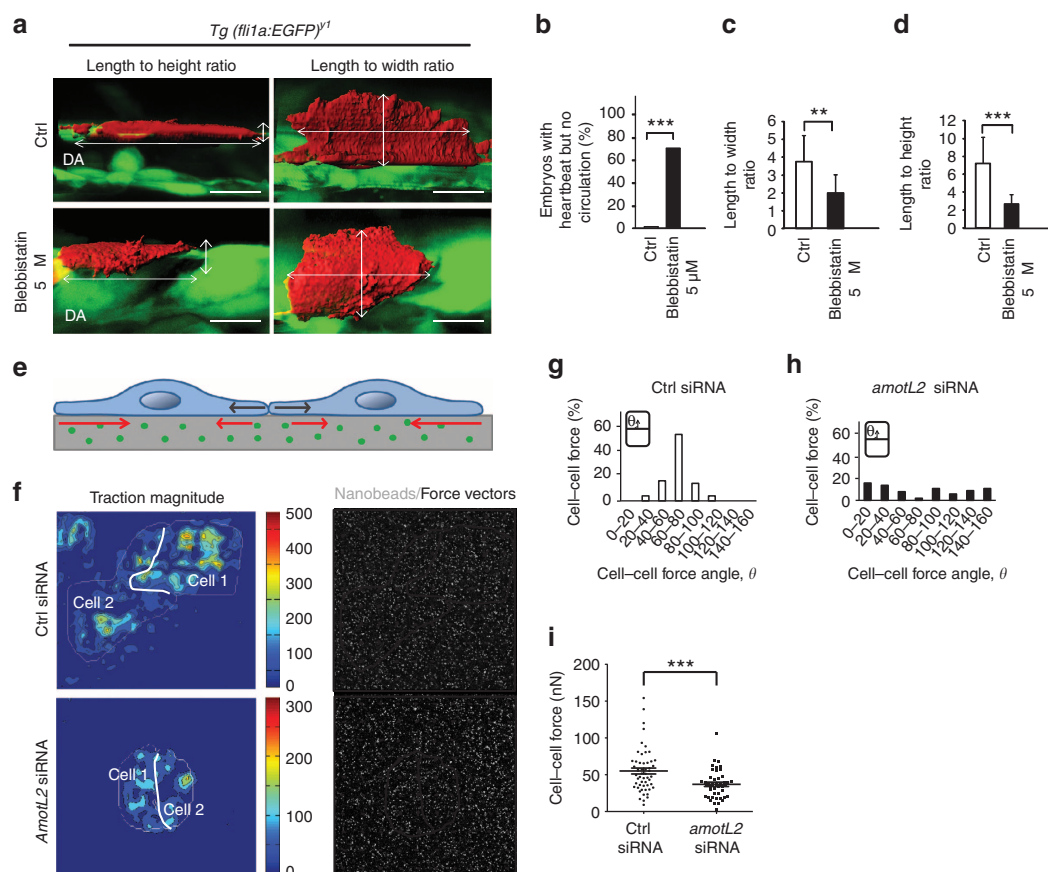


Figure 8 | AmotL2 is required for generation of actomyosin dependent cell-cell force. (a) Zebrafish embryos treated with 5 μ M of the actomyosin-inhibiting drug blebbistatin, during aortic lumen formation (18–20 h.p.f.) show defective circulation at 30 h.p.f. Sagittal (left) and dorsal (right), view of individual mCherry-positive DA endothelial cells in the *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* embryos (30 h.p.f.). Bidirectional arrows indicate the length and width dimensions. In blebbistatin-treated embryos, DA endothelial cells have altered cell shape. Scale bar 10 μ m. (b) Quantification of the circulatory phenotype in blebbistatin-treated embryos ($n(\text{ctrl}) = 57$ embryos, $n(\text{blebbistatin}) = 121$ embryos, P -value calculated by the χ^2 test). (c) Quantification of length to width ratio in dorsal aortic endothelia from blebbistatin-treated zebrafish embryos (control $n = 18$ cells, blebbistatin treated $n = 11$ cells, $P = 1.8 \times 10^{-3}$). (d) Quantification of length to height ratio in aortic endothelia from blebbistatin-treated zebrafish embryos ($P = 3.8 \times 10^{-5}$). P -values calculated by the student's t -test. (e) Illustration of the traction force microscopy experiment. MS1 cell-cell doublets were seeded onto hydrogel-embedded fluorescent beads (green). As the cells produce force, the consequent movement of the beads was used to calculate both the cell traction force (red arrows) and further the cell-cell force (black arrows) with Fourier Transform Traction Cytometry. (f) Traction stress magnitudes of a cell doublet (left). Grey line indicate the outline of the cells and the bold white line the region of the cell-cell junction used to calculate the force imbalance within the cell doublet. Stresses are given in Pascal. The images were divided into 10×10 squares and the resultant traction vector of each square was calculated (magnitude and angle) and presented (right, black arrows) superimposed with GFP-tagged nanobeads (200 nm, grey). Black lines indicate cell borders. For original image of traction vectors see Supplementary Fig. 5h. (g, h) Histogram presenting quantification of the angles between the cell-cell force and the cell-cell contact in the shown cell doublets. Pattern of force angle distribution between ctrl siRNA and *amotL2* siRNA cell doublets was significantly different. KS = 0.35, $P = 9.29 \times 10^{-5}$. P -value was calculated by the Kolmogorov-Smirnov test. (i) Scatter plot of the cell-cell force comparing ctrl siRNA-treated MS1 cell doublet ($n = 54$, mean \pm s.d. is 55 ± 29 nN) and *amotL2* siRNA-treated MS1 cell doublet ($n = 45$, mean \pm s.d. is 37 ± 19 nN), P -value was calculated by the student's t -test.

Tg(fli1a:EGFP)^{y1} (ref. 49);
Tg(kdr1:msna-EGFP)^{is1} (ref. 50);
Tg(cdh5:gal4)^{mu101} (ref. 51);
Tg(UAS:lifact-GFP)^{mu271};
Tg(flipe:GFP)^{ubs3};
Tg(UAS:mRFP);
Tg(UAS:VE-cadherinΔC-EGFP)^{ubs12} (ref. 52).

For vascular-specific expression of lifact-GFP double transgenic embryos *Tg(cdh5:gal4)^{mu101}*; *Tg(UAS:lifact-GFP)^{mu271}* were used, which we refer to in the text as Lifact fish³⁵.

Expression analysis. Parologue-specific epitopes were chosen for the production of anti-amotL2a antibodies. Affinity-purified rabbit polyclonal antibodies against the zebrafish amotL2a protein were made using the antibody production services of Innovagen (Lund, Sweden). For amotL2a, antibodies were made against the C-terminal epitope NH2- CQKAPSAVDLFKGVDDVSAE-COOH.

Total RNAs were isolated by RNeasy Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Each sample was reverse-transcribed into cDNA by miScript RT Kit (Qiagen) and was subjected to quantitative real time (qRT)-PCR analysis with miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). The following oligonucleotides were used:

amotL2a f1 5'-GGGCACCTTTATGCTCAACTCTTG-3'
amotL2a r1 5'-CGGCCTTGCTCTCGTCTT-3'
amotL2b f1 5'-CGCCCTTCAGCGAAGTTATTC-3'
amotL2b r1 5'-CCCGCACAACGTGACAATG-3'

Mouse amotL2 was detected with a rabbit affinity-purified antibody made against the C-terminal motif of human amotL2 (Innovagen, Lund, Sweden); NH2-CLDSVATSRVQDLSDMVEILL-COOH.

Western blotting. Dechorionated zebrafish embryos were mechanically homogenized in SDS sample buffer, after removal of the yolk, and loaded onto 10%

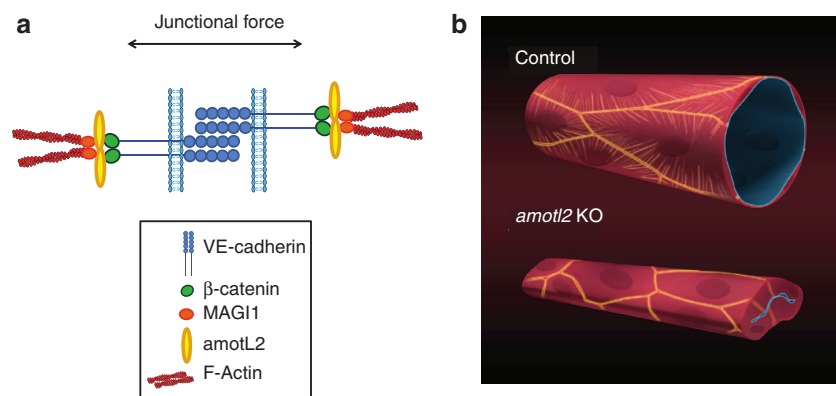


Figure 9 | Proposed model of the function of the VE-cadherin/AmotL2 complex during aortic lumen expansion. (a) AmotL2 is needed for the connection of the VE-cadherin/catenin complex to MAGI1 and actin filaments, and for transmission of force between neighbouring cells via the cellular junctions. (b) *amotL2* knockdown results in perturbed lumen expansion or collapse of the DA. The DA is made of elongated and flat endothelial cells that are connected by actin fibres (shown as yellow spikes). Actin fibres insert into the apposing endothelial adherens junctions (yellow borders), and enables transcellular transmission of mechanical force, and thus endothelial elongation. In *amotL2* KD animals, polarized endothelia (apical membranes are shown in blue) lack radial actin fibres, resulting in failed cell morphogenesis and luminal constrictions.

Bis-Tris gel. Cells were lysed with Triton X-100 before samples were loaded onto the gel. The following antibodies were used: anti-VE-cadherin (1:500, #555289, 11D4.1, BD Biosciences), anti-β-catenin (1:500, #610154, 14/beta-catenin, BD Biosciences), anti-α-catenin (1:500, #610193, 5/alpha-catenin, BD Biosciences), anti-MAGI1 (1:500, #WH0009223M3, 7B4, Sigma), anti-β-actin (1:20000, #ab3280, ALTN05CC4, Abcam). The mouse embryo E5-E19 western blot was ordered from Zymogen and *amotL2* was detected with a rabbit affinity-purified antibody against the C-terminal motif of human *amotL2*; NH2-CLDSVATSRVQ DLSDMVEILI-COOH (1:500). Uncropped scans of the western blots are provided as Supplementary Figs 9–12.

Cloning of zebrafish *amotL2a* and *amotL2b* genes. Database searches on Ensembl and NCBI with *hAMOTL2* identified two *amotL2* orthologues in the zebrafish genome. The sequence of *amotL2a* has previously been published³². To verify the putative *amotL2b* sequence, the complete gene was cloned and sequenced from a cDNA zebrafish library isolated from 48 h.p.f. embryos. *amotL2a* sequences were cloned by real-time PCR using the following primers and TOPO cloned into pCRII (Invitrogen) using the following primers:

amotL2a forward 5'-ATGAGAACGGCAGAGGAATC-3'
amotL2a reverse 5'-TGGACATTGTTATCTCAGATG-3'
amotL2b f1 5'-ACCAGGTGGACTACCAGCA-3'
amotL2b r1 5'-GTTCTGCTCTAGCCGTGTC-3'
amotL2b f2 5'-GGAGAAGGCCCTCAAATTC-3'
amotL2b r2 5'-AGTCCGTTATTGAGCTGGA-3'

Morpholino knockdown experiments. Morpholinos were purchased from Gene Tools (Philomath, Oregon, USA). The following morpholinos were used in this study:

amotL2a MO 5'-CTGATGATTCTCTGCCCCTTCTCAT-3'
amotL2b MO1 5'-TGAGTATTTATGATCTGAGCTGAAC-3'
amotL2b MO2 5'-TGAGTATTTATGATCTGAGCTGAAC-3'
amotL2b MO3 5'-AGCTGATCTAGTGTACCTTCTGAAT-3'
tnnt2 5'-CATGTTTCTGCTGATCTGACACGCA-3'
control 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

The *tnnt2* morpholino has been published³³. The *amotL2a* morpholino was injected at 1.25 ng per embryo and the *amotL2b* morpholino was injected at 2.5 ng per embryo. Morpholino-injected zebrafish embryos were maintained at 28 °C in standard E3 water supplemented with 0.003% phenyl-2-thiourea. Gene knockdown was confirmed molecularly by RT-PCR (*amotL2b*) or western blot (*amotL2a*). Circulation phenotypes were assessed at 48 h.p.f. An mRNA encoding human *AMOTL2* or *amotL2* mutants were synthesized using the SP6 Message Machine kit (Ambion, Austin, TX, USA), and 50 pg per embryo were co-injected together with the morpholinos.

For imaging individual endothelial cells, the Tol2 construct pDEST (*flil*:mCherryCAAX) was co-injected with Tol2 mRNA into newly fertilized embryos and DA cells were imaged at 28 h.p.f. following standard protocols⁵³. Briefly, the vector pDEST (*flil*:mCherryCAAX) containing Tol2 transposon sequences was co-injected (25 ng μl⁻¹) with Tol2 mRNA (35 ng μl⁻¹). The Tol2 mRNA was produced by *in vitro* transcription using mMessage mMachine Kit SP6 (#1340, Ambion). The mixture was injected into one-cell-stage embryos. At

28 h.p.f. embryos were dechorinated and mounted in 1% low-melt agarose on a coverslip for imaging of mCherry-expressing DA cells.

Pharmacological experiments. Pharmacological experiments with 10 μM cytochalasin D or 50 μM ROCK inhibitor Y-27632 (Sigma) were used to inhibit F-actin polymerization in zebrafish embryos from 18–28 h.p.f. For blebbistatin experiments, zebrafish embryos were treated with 5 μM blebbistatin from 18–20 h.p.f. and then moved to drug-free egg water for recovery. MS1 (Mile Sven1 pancreatic endothelial cells, ATCC CRL-2279) were treated with 5 μM blebbistatin for 2 h, whereupon they were washed with fresh medium.

siRNA transfection. For siRNA transfections, cells were seeded the day before transfection on glass slides (BD Falcon Cytoslides BD Biosciences) coated with 1% BD Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences) in growth medium without antibiotics. Just before transfection, growth medium was exchanged for OPTI-MEM I Reduced Serum Media (Invitrogen). Smartpool siGENOME siRNAs (Dharmacon/Thermo Scientific) against *amotL2* (M-062016-01), as well as non-targeting siRNA Pool #2 (D-001206-14) were transfected into the cells with Oligofectamine Transfection Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. siRNAs were used at the final concentrations of 0.32 μM for both control and *amotL2* siRNAs. Four hours after transfection serum was added to a final concentration of 20%. Cells were allowed to grow for 72 h prior to the evaluation by immunofluorescence staining or western blot.

Cytoo chip experiments. Control and *amotL2* siRNA-treated MS1 cells were seeded on starter fibronectin-coated Cytoo chips (10-900-10-26, France) and allowed to grow for 3 h. Cells were then fixed in 4% PFA and stained with anti-paxillin and phalloidin (TexasRed-X Phalloidin # T7471, Invitrogen).

Calcium switch assay. 30,000 cells per well were seeded onto glass slides (BD Falcon Cytoslides BD Biosciences) coated with 1.5% gelatin. Cells were allowed to attach and spread over night. The following day transfection with control and *amotL2* siRNA was performed, as described previously. Two days after transfection, medium was changed to calcium-free medium. Twenty-two hours later cells were put back into normal growth medium ($t = 0$ h), and allowed to grow for another 1, 2, 3 and 6 h respectively before fixation.

Immunofluorescence staining. Cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 4% PFA for 10 min at room temperature (RT). After washing in PBS, permeabilization was performed with 0.1% Triton X-100 for one minute at RT. Cells were again washed in PBS and blocked for 1 h in 5% horse serum (HS) at RT. Antibodies were diluted in the blocking solution, and all incubations were performed at RT. Incubations were 1 h for primary antibodies and 45 min for secondary antibodies. The following antibodies and stains were used; anti-VE-cadherin (1:100, #555289, 11D4.1, BD Biosciences), anti-ZO-1 (1:200, #339100, ZO1-1A12, Invitrogen), anti-paxillin (1:100, #610620, 165/Paxillin, BD Biosciences), anti-laminin (1:200, #L9393, polyclonal, Sigma), TO-PRO-3 iodide (642/661) (1:1000, #T3605, Invitrogen) and phalloidin (1:200, TexasRed-X Phalloidin # T7471, Invitrogen)/Phalloidin-Atto647N (1:200, #65906, Sigma), AlexaFluor 488/568 secondary antibodies (1:1000, Invitrogen).

Zebrafish embryos were fixed in 4% PFA/PBS at 4 °C overnight and processed for whole mount immunofluorescence staining following standard protocols. Rabbit antibodies against zebrafish podocalyxin and VE-cadherin/Cdh-5 have been previously published^{54,55}. For anti-VE-cadherin staining, embryos were fixed in 2% PFA/PBS/0.1% Tween20. Alternatively, 48 h.p.f. *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* zebrafish embryos were fixed, sectioned on a Leica Vibratome in 4% low-melt agarose at a thickness of 200 µm. Sections were stained with TexasRed-X Phalloidin for visualizing F-actin and TO-PRO-3 iodide for labelling the nuclei. Images were taken on a Zeiss LSM700 Confocal/Zeiss LSM5 Exciter confocal microscope and processed using ImageJ. Images of endothelial cells expressing mCherryCAAX under the *fli1a* promoter were processed with Imaris (Bitplane) to create a three-dimensional surface. Images of phalloidin and podocalyxin staining of *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* embryos were processed with Imaris (Bitplane) to minimize non-endothelial signal. This was performed by creating a new co-localization channel, showing only the podocalyxin positive pixels that also are positive for EGFP.

Mouse embryos (E8 or E9.5) were fixed in 4% PFA at +4 °C, overnight (O/N). Next day embryos were washed with PBS and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS at RT. Blocking was performed in 5% HS/0.1% Triton X-100/PBS at +4 °C, O/N. Embryos were washed with 5% HS/0.1% Tween20/PBS before incubation with primary antibody in the same buffer at +4 °C, O/N. After the antibody incubation, embryos were washed first with 5%HS/0.1%Tween20/PBS at +4 °C, and second with 0.1% Tween20 at +4 °C. After washing, embryos were exposed to a second fixation in 4%PFA for one hour at +4 °C. Thereafter, another washing was performed in 0.1%Tween20 in PBS. Secondary antibody incubation was performed as for the primary antibody. On the last day, embryos were washed in 0.1%Tween20 in PBS at +4 °C, fixed again in 4%PFA for 1 hat +4 °C, and washed in 0.1%Tween20 in PBS at +4 °C. Embryos were mounted on coverslips with ProLong Gold anti-fade reagent (#P36930, Invitrogen). For visualization of blood vessels anti-CD31 (#550274, MEC13.3, BD Biosciences) and for confirmation of knock down anti-GFP (#ab6673, polyclonal, Abcam) antibodies were used.

For amotL2 staining in mouse aorta, embryos were first sectioned sagittally with a Leica Vibratome in 4% low-melt agarose at a thickness of 350 µm; thereafter, staining and mounting was performed as described above.

Co-Immunoprecipitation. MS1 endothelial cell lysate were immunoprecipitated with anti-amotL2 polyclonal antibodies (reactive to human amotL2 C-terminal peptide, LDSVATSRVQDLSMDMEVLI) or anti-Myc Tag (#05-724, 4A6, Millipore). Immunocomplexes bound to protein A Sepharose beads were gently washed five times with lysis buffer (50 mM HEPES buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA and protease inhibitors) and separated by SDS-PAGE. amotL2 binding proteins were detected by western blot.

Traction force microscopy. Polyacrylamide gels were prepared as previously described⁵⁶. Briefly, an acrylamide solution containing 6.67% acrylamide and 0.167% bisacrylamide was mixed with fluorescent beads by sonication before the addition of APS and TEMED. For imaging, an Eclipse Ti inverted microscope (Nikon) with a ×60 oil immersion objective (Nikon 60 × 1.4 NA) and a Neo sCMOS camera (Andor Technology) was used. Two images of the beads, before and after cell doublet detachment, and one bright field image of the cell doublet were recorded. The global shift between the beads was determined by cross-correlation of the images. Cell detachment was performed with trypsin (Gibco).

The method used for force calculations on continuous substrates was described previously⁵⁷. Briefly, the force exerted by cell1 on cell2 is given by:

$$\vec{F}_{1/2} = \left[\sum_{\text{cell1}} \vec{T}_i \right]_{\text{after}} - \left[\sum_{\text{cell1}} \vec{T}_i \right]_{\text{before}} \quad (1)$$

A similar expression is used to obtain the force $\vec{F}_{2/1}$ exerted by cell2 on cell1. These two forces should be opposite with the same magnitude (the discrepancy between them is used as an estimation of the error on the cell–cell force value). The average tension at the cell–cell interface is estimated by:

$$\vec{F}_{\text{cell-cell}} = (\vec{F}_{1/2} - \vec{F}_{2/1})/2. \quad (2)$$

The fluorescent beads were tracked to obtain a displacement field with high spatial resolution. Using a combination of particle imaging velocimetry and particle tracking, the final displacement field is obtained on a regular grid using linear interpolation. Forces were reconstructed using Fourier transform traction cytometry with zeroth-order regularization, and the cell contractile strength could be estimated by calculating the strain energy U (forces multiplied by displacements), which represents the total energy transferred from the cell to the elastic distortion of the substrate. The force transmitted at a single cell–cell contact between doublets of cells was determined by calculating the balance of traction forces exerted on the extracellular matrix as previously introduced¹⁹. All calculations and image processing were performed in Matlab. For clearer visibility of force vectors, the images were divided into 10 × 10 squares with a grid. The resultant vector (magnitude and angle) of each square was calculated and presented in Fig. 7 (Original force vectors are shown in Supplementary Fig. 5).

Statistical analysis. For zebrafish experiments, over 60 larvae were analysed per condition. This gave 80% power to detect a 20% difference with 95% confidence. For mouse experiments, 10 embryos were assigned per group. This sample size gave 80% power to detect a 50% phenotypic difference with 95% confidence. For categorical qualitative analysis χ^2 test was used and for quantitative data evaluation two-tailed student's t -test was performed. Pattern distribution was analysed with Kolmogorov–Smirnov test.

References

- Herbert, S. P. & Stainier, D. Y. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 551–564 (2011).
- Strilic, B. *et al.* The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev. Cell* **17**, 505–515 (2009).
- Xu, K. & Cleaver, O. Tubulogenesis during blood vessel formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 993–1004 (2011).
- Zeeb, M., Strilic, B. & Lammert, E. Resolving cell-cell junctions: lumen formation in blood vessels. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 626–632 (2010).
- Iruela-Arispe, M. L. & Davis, G. E. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev. Cell* **16**, 222–231 (2009).
- Axnick, A., J. & Lammert, E. Vascular lumen formation. *Curr. Opin. Hematol.* **19**, 192–198 (2012).
- Davis, G. E. & Senger, D. R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ. Res.* **97**, 1093–1107 (2005).
- Carmeliet, P. *et al.* Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147–157 (1999).
- Gory-Faure, S. *et al.* Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **126**, 2093–2102 (1999).
- Xu, K. *et al.* Blood vessel tubulogenesis requires Rasip1 regulation of GTPase signaling. *Dev. Cell* **20**, 526–539 (2011).
- Zovein, A. C. *et al.* Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev. Cell* **18**, 39–51 (2010).
- Chung, A. S. & Ferrara, N. Developmental and pathological angiogenesis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 563–584 (2011).
- Eilken, H. M. & Adams, R. H. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 617–625 (2010).
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J. & Carmeliet, P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 639–649 (2009).
- Lohela, M., Bry, M., Tammela, T. & Alitalo, K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 154–165 (2009).
- Ingber, D. E. Tensegrity and mechanotransduction. *J. Biomech. Mov. Ther.* **12**, 198–200 (2008).
- Leckband, D. E., le Duc, Q., Wang, N. & de Rooij, J. Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 523–530 (2011).
- Liu, Z. *et al.* Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 9944–9949 (2010).
- Maruthamuthu, V., Sabass, B., Schwarz, U. S. & Gardel, M. L. Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 4708–4713 (2011).
- Borghi, N. *et al.* E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 12568–12573 (2012).
- Dejana, E., Orsenigo, F. & Lampugnani, M. G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* **121**, 2115–2122 (2008).
- Harris, E. S. & Nelson, W. J. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 651–658 (2010).
- Montero-Balaguer, M. *et al.* Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos. *PLoS One* **4**, e5772 (2009).
- Millan, J. *et al.* Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol.* **8**, 11 (2010).
- Nelson, W. J., Drees, F. & Yamada, S. Interaction of cadherin with the actin cytoskeleton. *Novartis Found. Symp.* **269**, 159–168; discussion 168–177, 223–130 (2005).
- Huveneers, S. *et al.* Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J. Cell Biol.* **196**, 641–652 (2012).
- Bratt, A. *et al.* Angiomotin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains. *Gene* **298**, 69–77 (2002).
- Aase, K. *et al.* Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis. *Genes Dev.* **21**, 2055–2068 (2007).

29. Ernkvist, M. *et al.* The Amot/Patj/Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. *Blood* **113**, 244–253 (2009).
30. Zheng, Y. *et al.* Angiomin-like protein 1 controls endothelial polarity and junction stability during sprouting angiogenesis. *Circ. Res.* **105**, 260–270 (2009).
31. Ernkvist, M. *et al.* p130-angiomin associates to actin and controls endothelial cell shape. *FEBS J.* **273**, 2000–2011 (2006).
32. Huang, H. *et al.* amotL2 is essential for cell movements in zebrafish embryo and regulates c-Src translocation. *Dev.* **134**, 979–988 (2007).
33. Sehnert, A. J. *et al.* Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat. Genet.* **31**, 106–110 (2002).
34. Jin, S. W., Beis, D., Mitchell, T., Chen, J. N. & Stainier, D. Y. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development* **132**, 5199–5209 (2005).
35. Helker, H., C. S. *et al.* The zebrafish common cardinal veins develop by a novel mechanism: lumen ensheathment. *Development* **140**, 2776–2786 (2013).
36. Nakayama, N., M. *et al.* Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nat. Cell Biol.* **15**, 249–260 (2013).
37. Schnittler, H. J., Puschel, B. & Drenckhahn, D. Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress. *Am. J. Physiol.* **273**, H2396–H2405 (1997).
38. Bratt, A. *et al.* Angiomin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility. *J. Biol. Chem.* **280**, 34859–34869 (2005).
39. Patrie, K. M. Identification and characterization of a novel tight junction-associated family of proteins that interacts with a WW domain of MAGI-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1745**, 131–144 (2005).
40. Sakurai, A. *et al.* MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of vascular endothelial cadherin-mediated cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* **17**, 966–976 (2006).
41. Dobrosotskaya, I. Y. & James, G. L. MAGI-1 interacts with beta-catenin and is associated with cell-cell adhesion structures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 903–909 (2000).
42. Dembo, M. & Wang, Y. L. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys. J.* **76**, 2307–2316 (1999).
43. Wang, Y. *et al.* Angiomin-like2 gene (amotL2) is required for migration and proliferation of endothelial cells during angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **286**, 41095–41104 (2011).
44. Dejana, E. & Vestweber, D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **116**, 119–144 (2013).
45. Bagnat, M., Cheung, I. D., Mostov, K. E. & Stainier, D. Y. Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut. *Nat. Cell Biol.* **9**, 954–960 (2007).
46. Strlic, B. *et al.* Electrostatic cell-surface repulsion initiates lumen formation in developing blood vessels. *Curr. Biol.* **20**, 2003–2009 (2010).
47. Pitulescu, M. E., Schmidt, I., Benedito, R. & Adams, R. H. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat. Protoc.* **5**, 1518–1534 (2010).
48. Traver, D. *et al.* Transplantation and *in vivo* imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat. Immunol.* **4**, 1238–1246 (2003).
49. Lawson, N. D. & Weinstein, B. M. *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**, 307–318 (2002).
50. Wang, Y. *et al.* Moesin1 and Ve-cadherin are required in endothelial cells during *in vivo* tubulogenesis. *Development* **137**, 3119–3128 (2010).
51. Bussmann, J., Wolfe, S. A. & Siekmann, A. F. Arterial-venous network formation during brain vascularization involves hemodynamic regulation of chemokine signaling. *Development* **138**, 1717–1726 (2011).
52. Lenard, A. *et al.* *In vivo* analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev. Cell* **25**, 492–506 (2013).
53. Fisher, S. *et al.* Evaluating the biological relevance of putative enhancers using Tol2 transposon-mediated transgenesis in zebrafish. *Nat. Protoc.* **1**, 1297–1305 (2006).
54. Blum, Y. *et al.* Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev. Biol.* **316**, 312–322 (2008).
55. Herwig, L. *et al.* Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo. *Curr. Biol.* **21**, 1942–1948 (2011).
56. Tseng, Q. *et al.* A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab Chip* **11**, 2231–2240 (2011).
57. Butler, J. P., Tolic-Norrelykke, I. M., Fabry, B. & Fredberg, J. J. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C595–C605 (2002).

Acknowledgements

This work has been supported by grants from the Swedish Cancer Society, Swedish Research Council, Cancer Society of Stockholm. C.H. and W.H. were funded by the NRW return fellowship. We would like to thank Jeffrey Essner for the Tg(kdrl:msna-EGFP)^{isl} transgenic line and Stefan Schulte-Merker for the double transgenic fish Tg(kdrl:EGFP)^{sl43}; Tg(gata1:dsRed)^{sd2} transgenic line. We are indebted to Dannel McCollum for sharing amotL2 constructs. Thanks to the Karolinska fish facility for providing embryos and raising fish strains. We thank the Knut and Alice Wallenberg Foundation (CLICK) and the Uppsala SciLife BioVis bio-imaging facility for providing microscopy facilities. Thanks to Bertrand Joseph for supportive discussions. We are grateful to Mattias Karlén for help with graphics.

Author contributions

L.H. S.H. and A.M. designed the experiments and wrote the manuscript. S.H., S.V. and A.M. performed the zebrafish experiments and whole mount stainings as well as confocal imaging. Y.Z. performed the mouse amotL2 KO and Co-IP experiments. M.M. performed *in vitro* analysis of cell shape and cytoskeleton. M.B. and R.M. designed and performed the traction force microscopy. H.-G.B. and M.A. contributed the VE-cadherin transgenic zebrafish and PDXL antibodies. R.H.A. contributed the cdh5(PAC)ERCre transgenic mouse, W.H. and S.M.H. contributed the Tg(cdh5:gal4)^{mu101}; Tg(UAS:lifact-GFP)^{mu271} transgenic zebrafish. P.U. helped with confocal imaging. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Hultin, S. *et al.* amotL2 links VE-cadherin to contractile actin fibres necessary for aortic lumen expansion. *Nat. Commun.* **5**:3743 doi: 10.1038/ncomms4743 (2014).

CHAPITRE V. La formation de pro-plaquettes anormales dans le syndrome MYH9 résulte de l'augmentation de la contractilité de l'actomyosine et est rétablit par l'inhibition de la myosine IIA.

1. Contexte

Comme on le voit sur le schéma de la coupe d'un vaisseau sanguin (Figure IV.1), la couche la plus interne du vaisseau est l'endothélium. C'est une couche mono-cellulaire constituée de cellules endothéliales. Ces cellules sont impliquées dans le maintien de la fluidité du sang et sécrètent des substances qui préviennent l'agglutination des plaquettes sanguines. La couche suivante est la couche sous-endothéliale qui contient du collagène sur lequel les plaquettes sanguines adhéreront lors d'un dommage au vaisseau sanguin. Participant aussi à l'hémostase¹², la couche du milieu d'un vaisseau sanguin, composée de cellules musculaires lisses, se contracte lorsqu'il y a dommage à un vaisseau sanguin, faisant ainsi réduire le débit de sang à cet endroit. Cette réduction du débit sanguin réduit la perte de sang et favorise l'accumulation de plaquettes sanguines. Ces plaquettes se collent à la paroi du vaisseau sanguin formant une fine membrane qui bouchera la blessure. On nomme cette obturation encore fragile, le clou plaquettaire ou le thrombus blanc. Ensuite, il y a des filaments de fibrine qui emprisonnent les globules rouges, les globules blancs et d'autres plaquettes au niveau du site endommagé. Puis, à la suite d'une cascade de réaction impliquant différents facteurs de coagulation, ces filaments de fibrine se polymérisent (se cristallisent) pour former le caillot sanguin. Finalement, lorsque le vaisseau sanguin est réparé, des enzymes dissolvent le caillot et la circulation sanguine peut reprendre son cours normal.

Les plaquettes (appelées aussi thrombocytes) sont des cellules dépourvues de noyau, qui circulent dans le sang et permettent l'arrêt d'hémorragies qui peuvent survenir au sein des vaisseaux sanguins endommagés. Les plaquettes (2-10 μ m) sont fabriquées par fragmentation des mégacaryocytes (MKs), cellules géantes (50 à 100 μ m) contenues dans la moelle osseuse par un processus

¹² L'hémostase est l'ensemble des phénomènes qui permet d'arrêter un saignement.

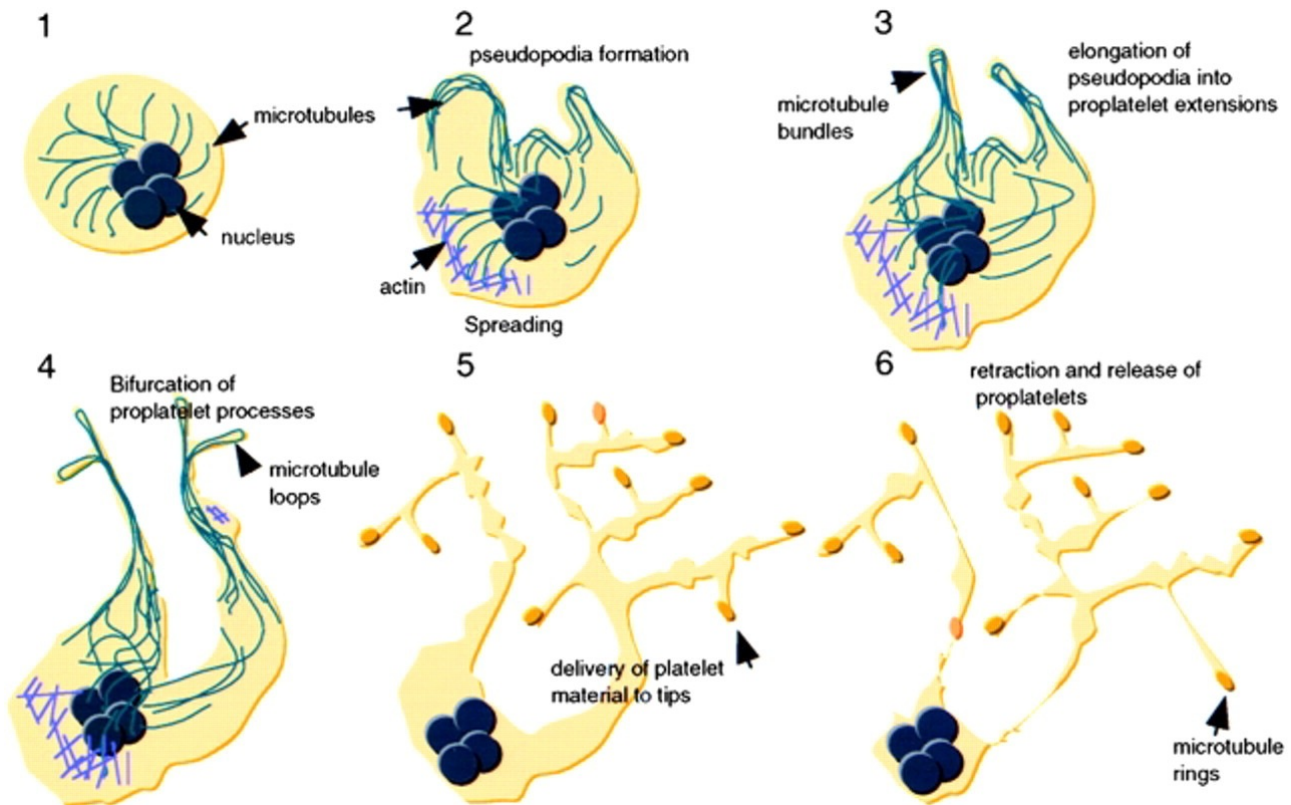


Figure V.1 Modèle de proplaquettes suggéré par Italiano et al, 1999. Après l'engagement de la lignée des mégacaryocytes, les cellules subissent la polyploïdisation et la maturation cytoplasmique (étape 1). Durant les étapes initiales de la PPF, les MKs remodelent leur cytoplasme en de larges pseudopodes (étape 2), contenant des paquets de microtubules situés juste en dessous de la membrane protubérante. Les pseudopodes s'allongent afin de former des extensions de proplaquettes contenant de larges paquets de microtubules (étape 3). Les PP se courbent et forment des branches à partir desquelles de nouvelles PPF apparaissent. Ces processus de PPF forment des rétrécissements sur leur longueur leur donnant l'apparence de perles (étape 5). Enfin, les proplaquettes sont libérées des MKs après rétractation (étape 6).

dynamique très particulier appelé formation de proplaquettes. À la fin de la différenciation, le mégacaryocyte forme des allongements cytoplasmiques par

déroulement des membranes de démarcation sous l'action du cytosquelette (rôle essentiel des microtubules) grâce au système d'actomyosine requis pour la migration des MKs, permettant d'éviter la formation prématurée des proplaquettes (Figure V.1).

Un groupe de macrothrombocytopénies héréditaires à transmission autosomique dominante¹³ associées à des mutations du gène MYH9, codant pour la chaîne lourde de la myosine non musculaire IIA (NMMHC-IIA), une protéine du cytosquelette contractile, a été récemment identifié comme étant la cause de la formation de plaquettes géantes.

Les mutations touchant le gène MYH9 se caractérisent par une thrombocytopénie (taux bas de plaquettes dans le sang: > 50 000 plaquettes/micro-litre de sang au lieu de 200 000 plaquettes/micro-litre de sang en moyenne) constituant un groupe très hétérogène et encore mal connu de maladies rares et associées à la présence de grandes plaquettes. Ces mutations ont tendance à augmenter le risque d'hémorragie interne ou externe. Ce syndrome est généralement associé à un et/ou plusieurs des symptômes suivant: inclusions leucocytaires (agrégats anormaux de protéine mutée), surdité, cataracte, atteinte rénale. Actuellement désignées sous le terme de «Syndrome MYH9», elles sont connues sous les noms d'Anomalie de May-Hegglin, Syndromes de Fechtner, d'Epstein, de Sebastian, et d'«Alport-like» avec macrothrombocytopénie. Les anomalies extra-hématologiques peuvent apparaître tôt dans l'enfance ou chez l'adulte habituellement avant 40 ans. Les critères évolutifs sont encore mal connus. En outre, en raison de la méconnaissance de ces pathologies, le diagnostic initial conduit souvent à des thérapies inefficaces, voire dangereuses.

¹³ Autosomique dominante est une des nombreuses façons dont un trait ou d'un trouble peuvent être transmis par les familles. Si une maladie est autosomique dominante, cela signifie que l'on a seulement besoin d'obtenir le gène anormal d'un parent pour hériter de la maladie.

Afin de mieux comprendre le défaut de formation des proplaquettes nous proposons d'étudier la formation des proplaquettes dérivées des mégacaryocytes (MK) générées in vitro à partir de 11 patients atteints de macrothrombocytopénie avec différentes mutations.

2. Résultats

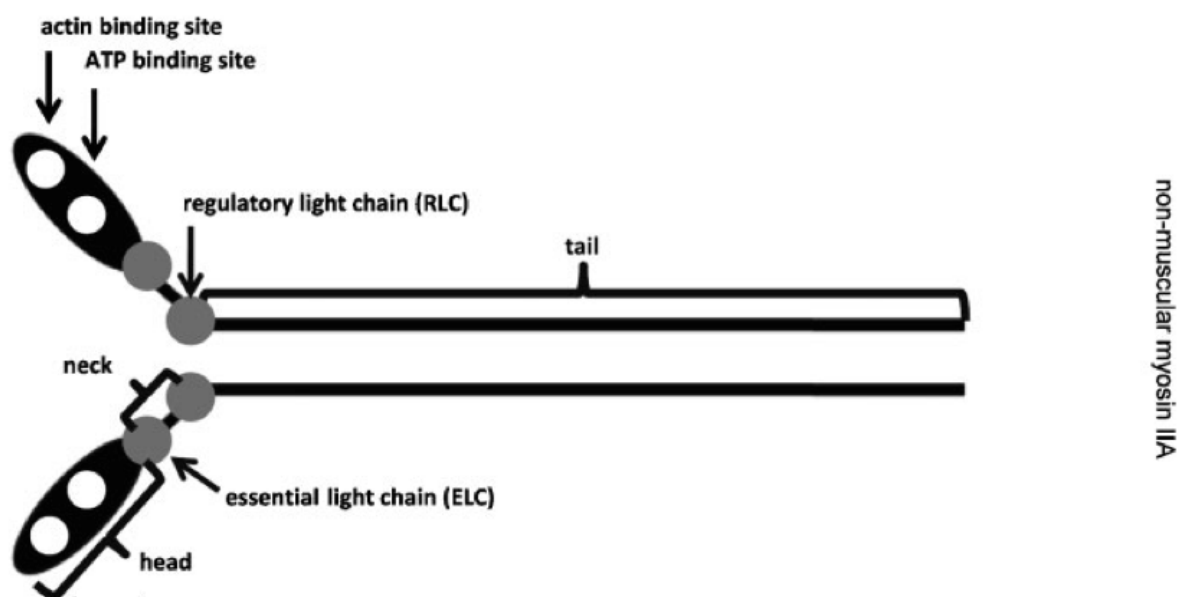


Figure V.2. Représentation schématique de la protéine NMM-IIA, qui consiste en deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères (points gris). La chaîne lourde est structurée en une tête, un cou et une queue. Les chaînes lourdes sont enroulées en hélice possédant chacune une tête pouvant se lier aux filaments d'actines. Au niveau du cou de la myosine s'enroulent les quatre chaînes légères, qui peuvent être phosphorylées par une kinase ou déphosphorylées par une phosphatase. En fonction de leur état, le complexe actomyosine sera contractile ou non. (Althaus et Greinacher, 2009).

Dans cette étude faite sur 11 patients, présentant les mutations MYH9 soit au niveau du site d'actine du domaine moteur de la tête de la myosine (Hu et al, 2002) ou du domaine de la queue bi-spirale contrôlant l'assemblage des filaments des muscles lisses et non musculaires de la myosine II (Ikebe et al, 2001, Figure V.2), nous avons montré que les MKs quelque soit leur mutation jouent un rôle important dans la formation des proplaquettes.

Nos résultats montrent que les 11 mutations du gène MYH9 porté par chacun des patients induisent une diminution des proplaquettes produites par les MKs, et ce quelque soit le jour de culture. Cette anomalie dans la formation des proplaquettes pour les patients est également accompagnée d'une diminution de leur surface par MK chez les patients ainsi que d'une diminution du nombre et d'un épaississement des branches formées par les proplaquettes sur la polylysine et la fibronectine (Figure V.4).

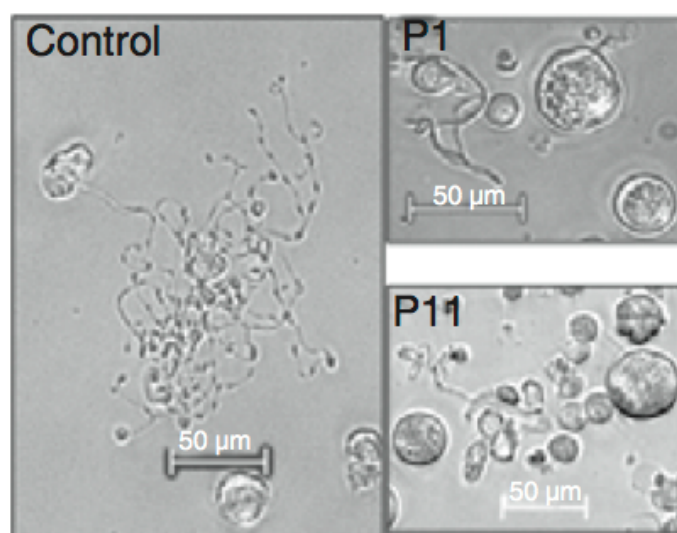


Figure V.4 Dans les cellules contrôles (patients sains), les proplaquettes sont allongées et affichent de nombreuses extensions contrairement aux cellules pathologiques.

Afin de mieux comprendre les conséquences des mutations du gène MYH9, l'organisation du cytosquelette d'actomyosine a été examinée à partir des marquages d'immunofluorescences (myosine II et phalloïdine) dans les MKs dérivés *in vitro* des cellules CD 34+ provenant des patients et cultivées sur différents substrats (polylysine, collagène et fibronectine). Ces résultats nous montrent que les mutations induisent une augmentation de l'aire d'étalement des cellules sur les différents substrats ainsi qu'une augmentation dans la formation des fibres de stress sein du cytosquelette d'actine sur les trois substrats différents. Cette distribution anormale de la myosine IIA semble mener à une hyper contractilité des MKs significative mais retardée.

Afin de quantifier la contractilité des MKs, j'ai effectué différentes expériences par TFM (Figure V.5). Nous avons étudié les forces de traction exercées par des cellules saines et mutées sur des gels de 5kPa fonctionnalisés avec du collagène et de la fibronectine. Ces expériences ont été faites sur plusieurs heures dans le but d'obtenir un suivi temporel des forces générées par les cellules. Nos résultats montrent que les mutations sur la tête et la queue de la myosine ne semblent pas affecter la contractilité durant les deux premières heures d'adhésion sur la fibronectine et le collagène. En revanche après douze heures d'adhésion les forces de traction augmentent de façon significative pour les patients par rapport aux contrôles ce qui peut expliquer pourquoi l'aire d'étalement des cellules augmente. En effet nous savons que généralement l'aire d'étalement des cellules est corrélée avec l'augmentation des forces de traction (Chen et al, 2003).

De façon intéressante lors de l'ajout de blebistatine ou de Y27632, qui induisent respectivement l'inhibition de la myosine II et de ROCK, une augmentation de la formation des proplaquettes est observée dans les cellules contrôles et mutées. Ainsi l'inhibition de la myosine II et de ROCK rétablirait la formation des proplaquettes suggérant que le défaut de formation des proplaquettes est relié

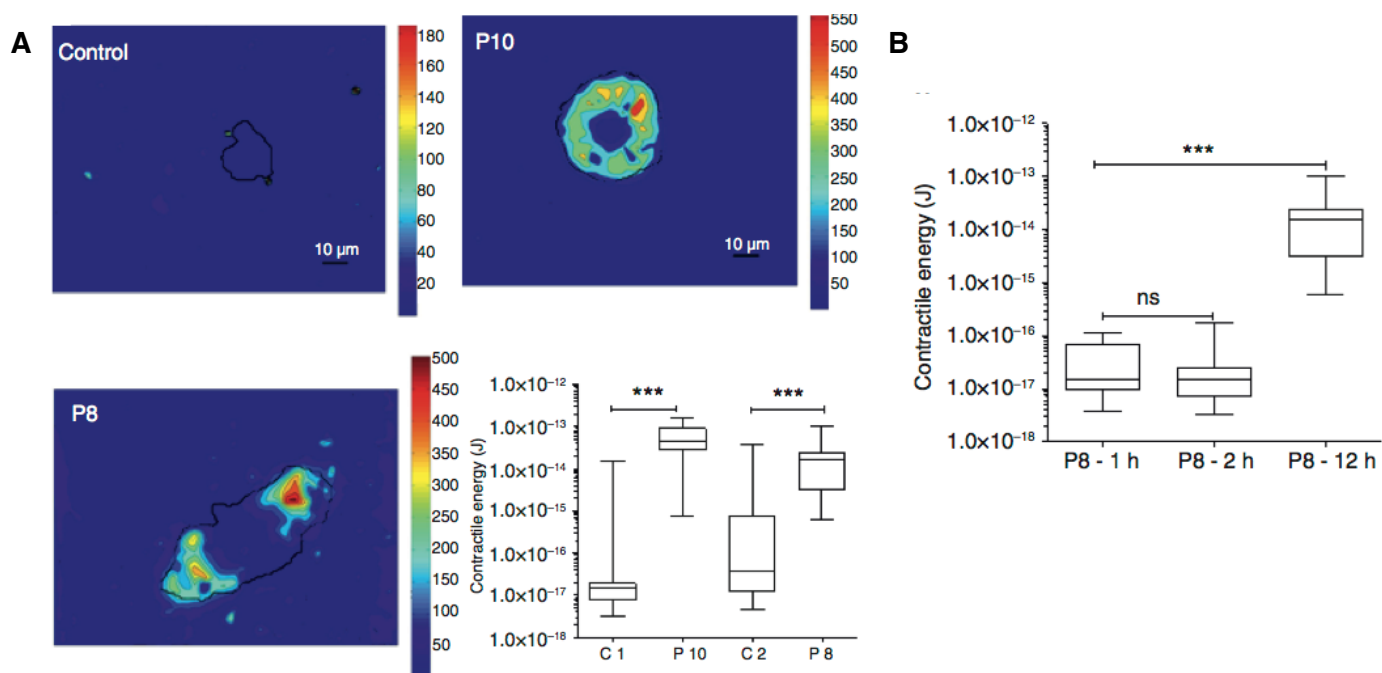


Figure V.5 A) Les cellules des patients atteints du syndrome MYH9 (P8, mutation du moteur, P10, mutation dans la queue de la myosine) présentent une contractilité bien plus élevée que celles des patients sains (contrôle C1 et C2) après 12h d'adhésion sur un gel de PAA de 5kPa. B) On remarque que ce défaut de contractilité n'est effectif qu'après 12h d'adhésion.

plus à un assemblage ou à une activité anormale de la myosine IIA ce traduisant par un excès de contractilité de l'actomyosine qu'à une pure perte de fonction.

Ces résultats nous montrent que dans le Syndrome MYH9, les mutations modifient l'ensemble des fonctions de MYH9 provoquant un excès de contractilité de l'actomyosine dans l'étalement des MKs. Ces résultats nous permettent de conclure qu'un traitement basé sur la réduction de la contractilité de l'actomyosine des plaquettes devrait être efficaces sur au moins quelques patients atteints de macrothrombocytopénie.

Article 2

ORIGINAL ARTICLE

The abnormal proplatelet formation in MYH9-related macrothrombocytopenia results from an increased actomyosin contractility and is rescued by myosin IIA inhibition

Y. CHEN,*†‡ S. BOUKOUR,*†‡ R. MILLOUD,§ R. FAVIER,*†¶ B. SAPOSNIK,** N. SCHLEGEL,** A. NURDEN,†† H. RASLOVA,*†‡ W. VAINCHENKER,*†‡ M. BALLAND,§ P. NURDEN††‡‡¹ and N. DEBILI*†‡¹

*INSERM, Gustave Roussy, UMR1009; †Université Paris-Sud, UMR1009, Gustave Roussy; ‡Gustave Roussy, UMR1009, Villejuif; §Laboratoire Interdisciplinaire de Physique UMR 5588, Université de Grenoble 1/CNRS, Grenoble; ¶Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Trousseau; **Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Robert Debré, Paris; ††Plateforme Technologique d'Innovation Technologique, Hôpital Xavier Arnoz, Pessac; and ‡‡Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, Hôpital La Timone, Marseille, France

To cite this article: Chen Y, Boukour S, Milloud R, Favier R, Saposnik B, Schlegel N, Nurden A, Raslova H, Vainchenker W, Balland M, Nurden P, Debili N. The abnormal proplatelet formation in MYH9-related macrothrombocytopenia results from an increased actomyosin contractility and is rescued by myosin IIA inhibition. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2163–75.

Summary. *Background:* Mutations in the *MYH9* gene cause autosomal dominant MYH9-related diseases (MYH9-RD) that associate macrothrombocytopenia with various other clinical conditions. The mechanisms giving rise to giant platelets remain poorly understood. *Objectives/Patients:* To study the proplatelet formation (PPF) derived from megakaryocytes (MKs) generated *in vitro* from 11 patients with MYH9-RD with different mutations, compared with controls. *Methods:* Proplatelet formation from cultured patients' MKs was evaluated with or without blebbistatin or the ROCK inhibitor Y27632. Myosin IIA and actin distribution were studied in spreading MKs on different surfaces by immunofluorescence analysis. Kinetic studies of contractility were performed on spreading MKs and the impact of blebbistatin on the maturation of the patients' MKs was evaluated by electron microscopy. *Results and Conclusions:* We show that *in vitro* MKs of 11 patients formed significantly fewer proplatelets than controls. MKs from MYH9-RD displayed an abnormal spreading on polylysine, fibronectin and collagen, with a disorganized actin network and a marked increase in stress fiber formation. Traction force

microscopy studies demonstrated an elevated level of contractile forces in adherent mutated MKs. The myosin II inhibitor blebbistatin and the ROCK inhibitor Y27632 both rescued the proplatelet formation defect and normalized the ultrastructural characteristics of MYH9-RD MKs. Altogether, our results show that in MYH9-RD, mutations modify the overall MYH9 function and provoke a proplatelet defect through an excess of actomyosin contractility in spreading MKs. These results may promote new therapeutic strategies aimed at reducing this actomyosin contractility.

Keywords: blebbistatin; contractile proteins; megakaryocytes; MYH9 protein, human; platelet.

Correspondance: Najet Debili, INSERM, U 1009, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France.
Tel.: +33 1 42 11 41 13; fax: +33 1 42 11 52 40.
E-mail: denali@igr.fr

¹These two authors have equally contributed to this manuscript.

Received 15 December 2012

Manuscript handled by: S. Watson

Final decision: D. Lane, 10 October 2013

Introduction

Megakaryocyte (MK) differentiation is a process that ultimately leads to the release of platelets into the blood circulation [1,2]. Dynamic forces are provided by the microtubule networks [3,4]. The actomyosin system is required for MK migration, to avoid premature proplatelet formation (PPF) [5,6] and also, at later stages, to allow branching of proplatelets [5,7–9].

MYH9 is the only heavy chain of non-muscle myosin type II present in normal platelets, whereas MYH10 is expressed in early stage MKs [10–12]. MYH9-related diseases (MYH9-RD), caused by mutations in the *MYH9* gene [13,14], are autosomal dominant macrothrombocytopenias that can be associated with glomerular impairment, hearing loss and cataracts. More than 40 point mutations located in multiple different *MYH9* exons have

been identified [15–17]. Mutations in the motor head domains are likely to lead to a more severe phenotype with more clinical abnormalities besides macrothrombocytopenia [18–20].

Different murine models based on *Myh9* depletion or Knock-in (KI) with the mutants have been developed to phenocopy MYH9-RD. Homozygous, but not heterozygous, deletion of *myh9* in MKs induces premature PPF and macrothrombocytopenia [21,22]. However, MYH9-RD patients are usually heterozygous for the mutation [18] with the presence in most patients of significant levels of mutated myosin IIA protein, which associates with the normal MYH9 [23]. Thus *MYH9* mutants rather behave as hypomorphic alleles [24] or dominant negative mutants. KI mouse models for different mutations have been developed, showing macrothrombocytopenia and PP defects in heterozygous animals, thus indicating that these mutants do not phenocopy a pure haploinsufficiency [25].

To better understand the PP defects induced by *MYH9* mutations in human disease, we have analysed PPF from MKs of 11 MYH9-RD patients with different *MYH9* mutations. We observed a decreased PPF for all the patients, which was associated with an abnormal myosin IIA distribution and contractility in spreading MKs. Strikingly, inhibition of myosin II activity rescued the defects in PPF and improved MKs' ultrastructural features. These results suggest that the defect in PPF in MYH9-RD patients is related to abnormal assembly or activity of myosin IIA that can be reversed by reducing myosin IIA contractility.

Materials and methods

In vitro liquid MK cultures

Peripheral blood was collected from patients or healthy donors after informed consent. Ethical approval was obtained from INSERM N° RBM01-14 for the project 'Network on the inherited diseases of platelet function and platelet production'. After Ficoll separation, CD34⁺ cells were purified by cell sorting and cultured in serum-free medium supplemented either with recombinant human thrombopoietin (TPO; 10 ng mL⁻¹; Kirin Brewery, Tokyo, Japan) or an MPL agonist (AMP2; 10 ng mL⁻¹; Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) as described previously [7].

Proplatelet formation

For PPF, 3000 MKs were plated in 96-well plates as previously described and PPF was assessed on more than 200 MKs [7]. In some experiments, Y27632 or blebbistatin (all from Calbiochem, Darmstadt, Germany) were added at day 10 to the MK culture. PP surface areas were quantified as previously described [26]. Length of platelet extensions was measured from the MK periphery to the tip, platelet-like structures were measured at the tip of the

PP and the number of branches evaluated. All measures were performed with AxionVision Software (Zeiss, Marly Le Roi, France).

Assessment of polyploidization

Ploidy analysis was performed at day 10 of culture as previously described [26].

Construction of plasmid DNA and virus production

The dominant negative forms of MYH9 corresponding to the DNA fragment encoding Leu 1666-Glu1961 (ARF296) fused to GFP in its N-terminal domain were subcloned into the lentiviral vector sinPRRL-MCS-WPRE (Genethon Evry) [27]. The sinPRRL-PGK-GFP lentivirus was used as a control. Lentiviral stocks were prepared as previously described [26].

Cell transduction

CD34⁺ cells were prestimulated for 24 h with TPO (10 ng mL⁻¹; Kirin Brewery), Stem Cell Factor (SCF; 50 ng mL⁻¹; Biovitrum AB, Stockholm, Sweden) and Fetal Liver Tyrosine Kinase 3 Ligand (FLT3-L; 10 ng mL⁻¹; Celldex Therapeutics, Needham, AL, USA). Lentiviral particles were added at day 1 of culture. Cells were then cultured in the presence of TPO alone.

Immunofluorescence microscopy

Cells were allowed to spread for 1 h at 37 °C on coated collagen type I (50 µg mL⁻¹ at 4 °C overnight; Nycomed, Munich, Germany), fibronectin or polylysine slides (VWR International, Fontenaysous-Bois, France), then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), washed and permeabilized for 5 min with 0.2% Triton-X100, then washed with PBS. The staining was performed as previously described [26].

Measurement of traction forces between adherent MK and a fibronectin substrate

MKs derived from either controls or patients (P10 and P11) were allowed to spread overnight at 37 °C with 5% CO₂ on fibronectin-coated polyacrylamide gels with embedded fluorescent microbeads. The traction of the cells induces a deformation of the gel and hence displacement of the microbeads. Regarding the matrix rigidity choice, we have chosen 5 kPa because it matches with *in vivo* tissue stiffness, values that typically range from 1 kPa for the brain up to 100 kPa for collagenous bones [28]. The traction force microscopy calculations were performed as previously described [29]. A homemade Fourier Transform Traction Cytometry (FTTC) algorithm with zeroth-order regularization computed cellular traction forces from the measured substrate displacements. Force

reconstruction was conducted with the assumption that the substrate is a linear elastic half-space. Phenotype characterization was estimated through the calculation of the strain energy U (J), which represents the total energy transferred from the cells to the substrate on which they adhere. All calculations and image processing are performed in Matlab (Matrix Laboratory, [www. Math works.fr](http://www.Mathworks.fr)).

Electron microscopy

Cultured MKs were fixed at day 12 in 1.25% glutaraldehyde (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.2) for 1 h at room temperature as previously described [26]. Samples were processed for electron microscopy (EM) according to our standard procedures and sections were examined using a Jeol JEM-1010 transmission electron microscope (Jeol, Croissy-sur-Seine, France).

Antibodies

PE- or allophycocyanin (APC)-conjugated CD41a and fluorescein (FITC)-CD42 were purchased from Pharmingen (Becton Dickinson-Pharmingen, Le Pont de Claix, France).

Results

The MYH9-RD mutants decrease proplatelet formation

We selected 11 patients with *MYH9* mutations in either the actin-binding site of the head motor domain [30] (patients 8, 9 and 11) or the coiled-coil tail domain that controls filament assembly [31] (the other patients; Fig. 1, Table 1). All patients showed a macrothrombocytopenia with a platelet count ranging from 10 to 110×10^3 platelets per μ L. For some patients other symptoms were present, such as deafness (patients 1, 5, 8, 9 and 11), kidney

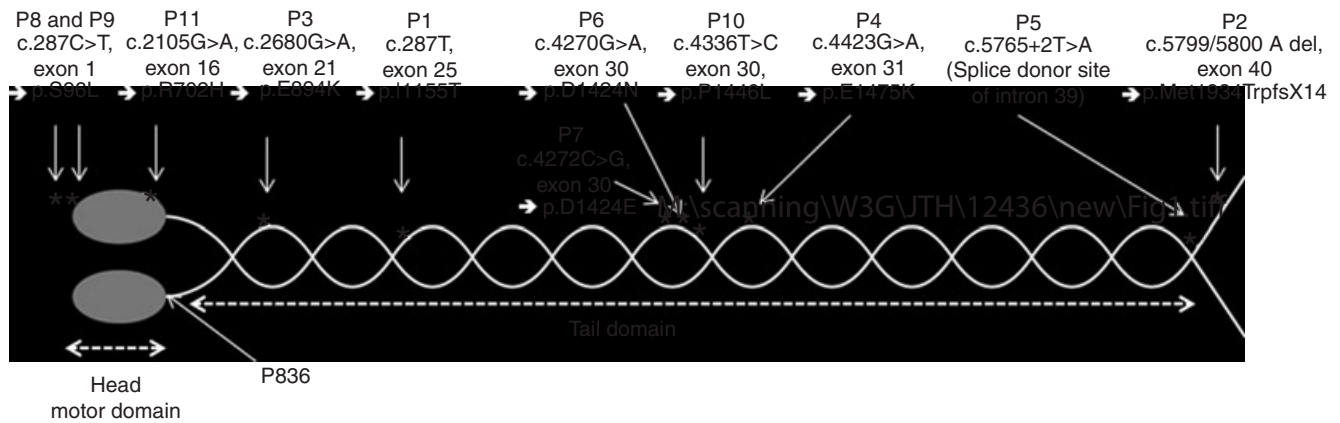


Fig. 1. Localization of *MYH9* mutations in patients. Mutations for P8, P9 and P11 are located in the head domain and affect the actin-binding domain and ATPase activity, whereas the other mutations affect the tail domain and are likely to impair filament assembly [30]. P836 constitutes the junction between the head and tail domain.

Table 1 Patient characteristics

Patients	cDNA nucleotide changes	Exons	NMMHC-IIA mutations	Motor/Tail domain (MD/TD)	Platelet count G/L	Bleeding syndrome	Associated extra-hematological symptoms
P1	c.287T	25	p.I1155T	TD	20	No	Deafness, kidney disease, cataracts
P2	c.5800 delA	40	p.Met1934TrpfsX14	TD	30	No	
P3	c.2680G>A,	21	p.E894K	TD	80	No	Kidney disease
P4	c.4423G>A	31	p.E1475K	TD	103	No	No
P5	c.5765 + 2T>A	Intron 39	Cannot be predicted	TD	47	No	Deafness
P6	c.4270G>A	30	p.D1424N	TD	30	No	
P7	c.4272C>G	30	p.D1424E	TD	68	No	No
P8	c.287C>T	1	p.S96L	MD	18	Present after trauma	Deafness, kidney disease
P9	c.287C>T	1	p.S96L	MD	18	Present after trauma	Deafness
P10	c.4336T>C	30	p.F1446L	TD	52	No	No
P11	c.2105G>A	16	p.R702H	MD	110	No	Deafness, kidney disease

disease (patients 1, 3, 8 and 11) and cataracts (patient 1). We generated MKs from CD34⁺ cells in liquid culture. At day 10 and day 12 of the culture (corresponding to the peak of PPF), the production of mature MKs as defined by a high expression of CD41 and CD42 (CD41⁺CD42⁺) was similar, whatever the location of the mutation, with more than 90% of the cells showing a mature MK phenotype (Fig. 2A). Their mean ploidy was similar to that of controls (Fig. 2B). MKs derived from blood CD34⁺ cells were sorted and seeded in 96-well plates to quantify PPF [7]. At day 12, the mean percentage of MKs producing PP was dramatically reduced in 11 patient samples compared with 10 controls ($4.45\% \pm 1.01$, $n = 11$ vs. $18.36\% \pm 3.24$, $n = 10$, $P < 0.0005$; Fig. 2C). Identical results were obtained for patients studied repeatedly on different occasions (P1, P2, P5, P9 and P8). We performed a kinetic study of PPF for two patients with mutations in the head domain (P8 and P11) and two patients with mutations in the coiled-coil domain (P1 and P10). For all patients, PPF remained low in comparison to the controls whatever the day of culture, implying that the defect in PPF was not related to a premature or delayed PPF (Fig. 2D). The quantitative defect in PPF for patients corresponded to a decrease of the total surface area of the PP network [26], 2.3-fold lower in patients than in controls (12 MKs were quantified for each subject, $P < 0.0001$; Fig. 2E,G). This defect was associated with a significant decrease of PP branching points (Fig. 2F) and an increased size of the platelet-structure at the tip of the proplatelet (Fig. 2H). However, we did not find any significant decrease in PP length starting from the final branching point to the tip when present (data not shown). This last measurement was performed on only a limited number of PPs due to the major quantitative defect in PPF.

A dominant negative protein induces an increase in proplatelet formation

To study whether MYH9 mutants could affect the level of myosin IIA in patients, we performed a Western blot on cultured MKs derived from patients with a mutation in the head domain (P11) or mutations in the coiled-coil domain (P1 and P10). MYH9 was detected at a normal level in patients with MYH9 mutations in the coiled-coil domain (P1 and P10), as previously described [23]. However, an approximately 40% decrease of MYH9 was found in the patient with a mutation in the head domain (P11; Fig. 3A). Thus, the MYH9 mutants, especially the coiled-coil mutants, may either behave as a dominant negative or exhibit a different function to the wild-type molecule. To test the first hypothesis, we transduced a rod domain of MYH9 (ARF296), which has been demonstrated to be a dominant negative form of MYH9 [27], into normal MKs with a lentiviral vector and observed an increase in PPF (Fig. 3B). Moreover, ARF296-trans-

duced MKs, when spread on collagen, did not form stress fibers, in contrast to the control MKs transduced with an empty vector (Fig. 3C) or with the cultured MYH9-RD MKs (Fig. 4). This result strongly suggests that MYH9 mutants do not behave as dominant negatives.

MYH9-RD MKs display abnormal actomyosin cytoskeleton and elevated traction forces

To better understand the consequences of MYH9-RD mutations, we examined the organization of the actomyosin cytoskeleton in MKs derived *in vitro* from patient CD34⁺ cells using dual immunofluorescence staining (myosin IIA and phalloidin) and confocal analysis. MKs collected at day 10 were transferred on polylysine, collagen I or fibronectin slides for 1 h. Compared to MKs from healthy controls, MKs from MYH9-RD patients with a mutation in the head domain (P8) showed a significantly increased cell spreading on polylysine whereas those with a mutation in the coiled-coil domain (P2) had only a slight increase in spreading (Fig. 4A). In contrast on fibronectin, patients with coiled-coil mutations had a marked increase in MK spreading (Fig. 4B). No differences in spreading area were found for P8 MKs on collagen compared with control MKs (Fig. 4C).

MYH9 was heterogeneously distributed with a colocalization with polymerized actin in structures identified as stress fibers in 30% of MYH9-RD MKs (P2 or P8) adherent on polylysine and fibronectin as compared with less than 1% in control MKs (Fig. 4D,E), and in 82% of P8 MKs adherent on collagen vs. 4% for the controls (Fig. 4F). In addition, the polymerized actin network was disorganized in MYH9-RD MKs frequently localized in aggregates or in cables with or without the presence of myosin IIA (Fig. 4E, P2-a, P2-b). By combining myosin labelling with that of VWF, the distribution of α -granules was also seen to be heterogeneous in MKs derived from patients, with some MKs having many α -granules in clusters while others had only a few α -granules (Fig. S1).

To investigate whether the abnormal actomyosin distribution leads to MKs' hypercontractility, we performed a traction force microscopy study. Day 10 MKs derived from controls (C1, $n = 18$; C2, $n = 23$) or from patients with mutations either in the motor (P8, $n = 24$) or the coiled-coil (P10, $n = 23$) domains were allowed to spread for 1, 2 and 12 h (P8) or only 12 h (P10) on fibronectin coated on 5 kPa poly-acrylamide hydrogels, as previously described [29]. Results shown in Fig. 4(G) revealed that adhesion for 1 and 2 h did not reveal any defect in contractile force in patient MKs with mutations in the motor domain (P8). However, after 12 h of adhesion, MKs of both sets of patients displayed a strong cell substrate interaction that leads to a highly specific elevation in the traction forces compared with control MKs (Fig. 4G–H).

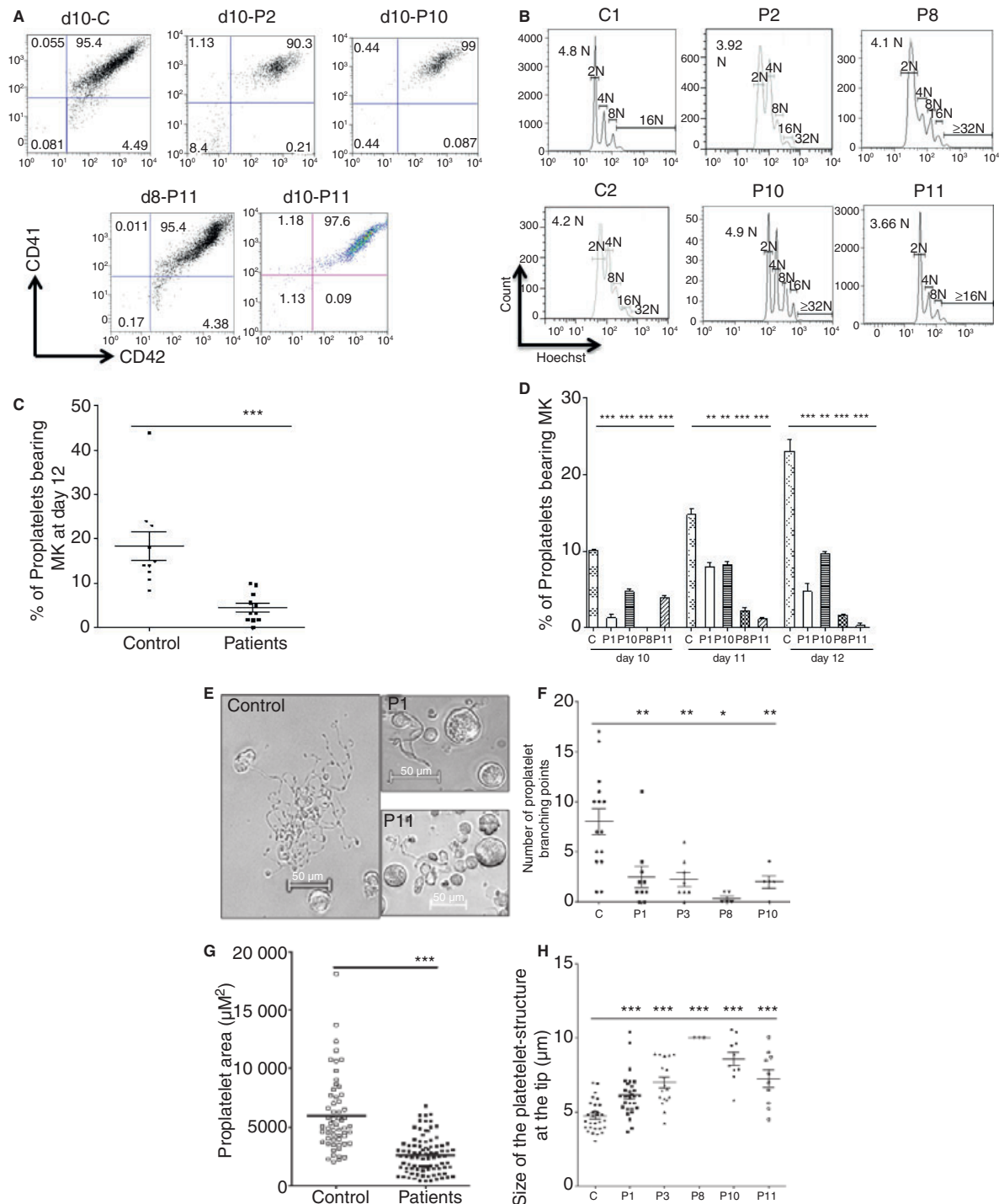


Fig. 2. Normal polyploidization but decreased proplatelet formation by patient MKs. (A) Normal MK differentiation assessed by the expression of CD41 and CD42 in patients. The antibodies are highly specific and equivalent amounts of control IgG did not give any background fluorescence. (B) Normal mean ploidy values in MKs derived from patients with mutation in the coiled-coil (P2 and P10) or in the head motor (P8 and P11) domains compared with controls (C1 and C2). (C) Proplatelets were scored at day 12 under an inverted microscope. Results are expressed as the mean of PP counts from 11 patients (4.5%) vs. 10 controls (18.3%) (*t*-test *P* < 0.0003). (D) PPF kinetic studies from day 10 to day 12 for patients mutated in the head domain (P8 and P11) and in the coiled-coil domain (P1 and P2; ****P* < 0.0002). (E–F) Proplatelets were long and displayed branching point extensions in controls; branching points per MK were counted in controls (C) and patients (*t*-test **P* < 0.05; ***P* < 0.004). (G) Decrease of proplatelet surface area per MK in patients. Results from five matched patients (P1, P2, P5, P8 and P9) compared with five matched controls at day 12 of culture. Twelve MKs for each patient and for each control were quantified (*t*-test *P* < 0.0001) (H) Size increase of the platelet-structure at the tip. ****P* < 0.0001. Area and platelet-structure size were analysed using the Axiovision software (Zeiss)

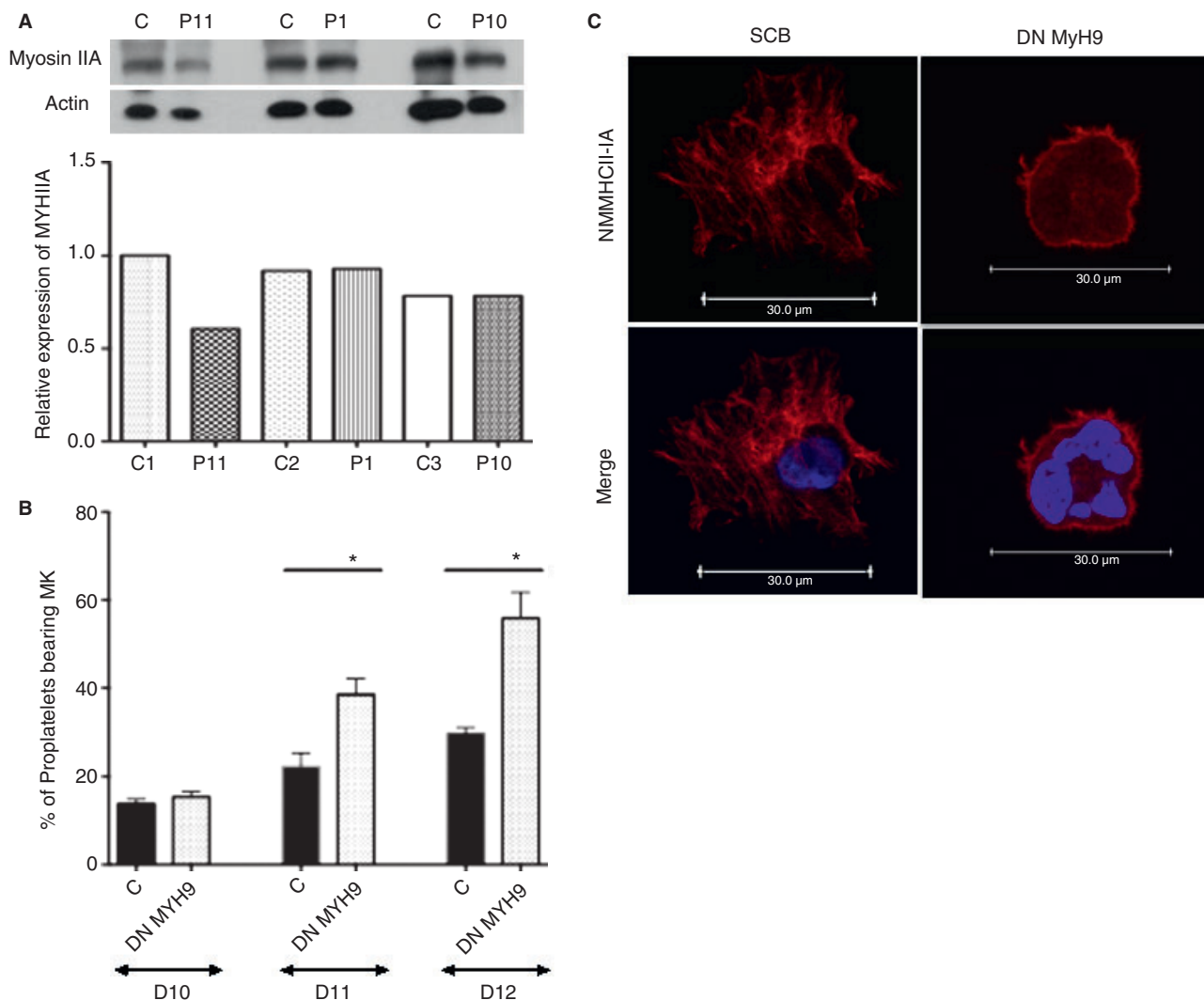


Fig. 3. A dominant negative expression of the rod fragment of MYH9 induces an increase in proplatelet formation. (A) Relative expression of MYH9 showed the protein to be at normal levels in two patients with mutations at the coiled-coil domain and at a decreased level in a patient with a mutation in the head domain. (B) Time course analysis shows increased PPF in MKs expressing the MYH9 rod fragment (representative experiments of $n = 3$, $P < 0.03$). (C) Immunofluorescence analysis shows loss of stress fibers in MKs transduced with ARF296 compared with control.

Inhibitors of myosin II and ROCK improve proplatelet formation

Treatment of day 10 MKs with blebbistatin, a chemical inhibitor of myosin II ATPase, increased PPF (Fig. 5A). Strikingly, this effect was observed on MKs generated from both control and MYH9-RD CD34⁺ cells, with a significantly higher PPF-inducing activity on MKs from patients than those from controls, leading to a nearly complete rescue of the quantitative PPF defect (means at day 11 and 12, respectively, P10, 8.3% and 9.6% without and 20.3% and 35% with blebbistatin, $P < 0.0002$; P11, 1.16% and 0.33% without and 23.4% and 16.3% with blebbistatin, $P < 0.0002$; controls, 14.9% and 23.0% without and 21.8% and 34.5% with blebbistatin). Thus, blebbistatin increased PPF up to 70-fold in patients but

only up to 2-fold in controls. As we had observed spontaneous stress fiber formation in MKs from patients, we tested the effects of the ROCK inhibitor Y27632. As shown in Fig. 5(A), Y27632 and blebbistatin had very similar effects; that is, Y27632 increased the percentage of proplatelet-forming MKs to 19.0% and 17.6% at day 11 and 19.6% and 16.3% at day 12 for P10 and P11, respectively, which was further confirmed in all other studied patients, regardless of the type of mutation (Fig. 5B–C).

Blebbistatin modifies MK and proplatelet ultrastructure

In addition to increasing PPF, blebbistatin was observed to correct proplatelet morphology. When compared with untreated MYH9-RD MKs, the proplatelet morphology of MYH9-RD MKs treated with blebbistatin showed an

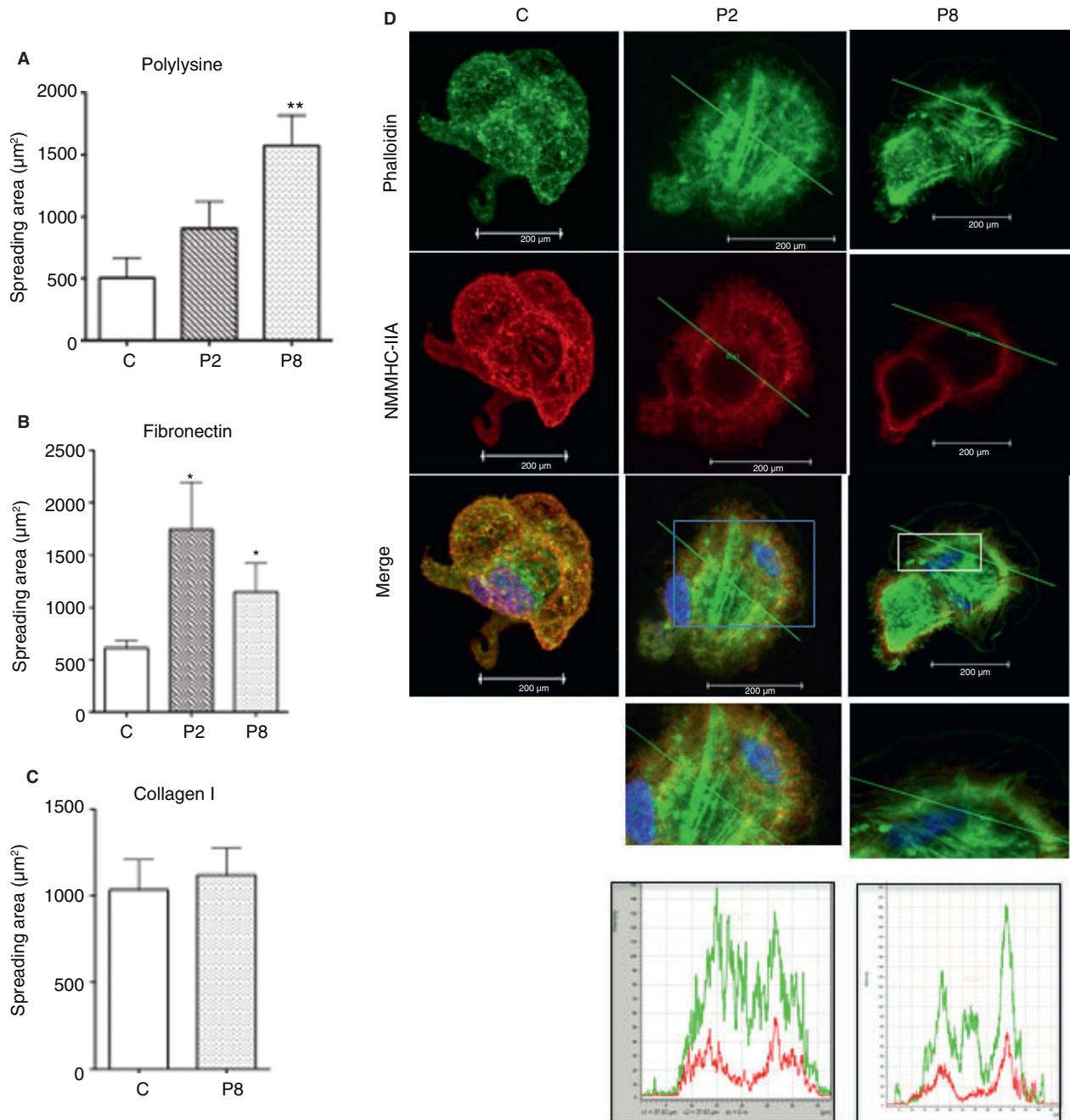


Fig. 4. Immunoconfocal analysis of actomyosin in patient MKs adherent to polylysine collagen I, fibronectin and contractile force studies. (A–C) Area spreading on polylysine (A), fibronectin (B) and collagen (C) slides. At least 18 Mk were analyzed by the software Volocity (Perkin Elmer). * $P < 0.05$. (D–F) Actomyosin stress fibers on polylysine (D), fibronectin (E) or collagen (F) slides. Confocal imaging was performed on a Leica TCS SP8 inverted laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), equipped with a diode 405 nm UV laser and visible OPSL lasers (488 nm and 552 nm). All images were acquired using an oil immersion 63 \times objective (1.4 NA). The graphs represent the fluorescence distribution determined for the sections shown. (G, H) Traction force microscopy studies performed after adhesion on fibronectin matrix. Patient MKs (P8, mutation in the motor, and P10, mutation in the coiled-coil domain) induce increase of the contractile force after 12 h of adhesion but the control MKs did not. $n > 18$ cells per condition (ANOVA Tukey test, *** $P < 0.0001$; ns, not significant G). Increase of contractile activity in MYH9-RD MKs (head domain P8, $n = 24$; coiled-coil domain P10, $n = 23$) compared with control MKs after 12 h of adhesion (C1, $n = 18$; C2, $n = 23$). (H) Kinetic study. Mutant MKs maintain contractile forces at a low energy during the first 2 h then increased forces at 12 h. *** $P < 0.0001$

increase in the branched structures and normalized the platelet-like structure size at their tips (Fig. 6A,B); in parallel, control proplatelets showed a slight although signifi-

cant decrease in bud size (Fig. 6B). Electron microscopy showed that cultured MYH9-RD MKs (Fig. 6D-c) displayed abnormalities similar to those observed directly

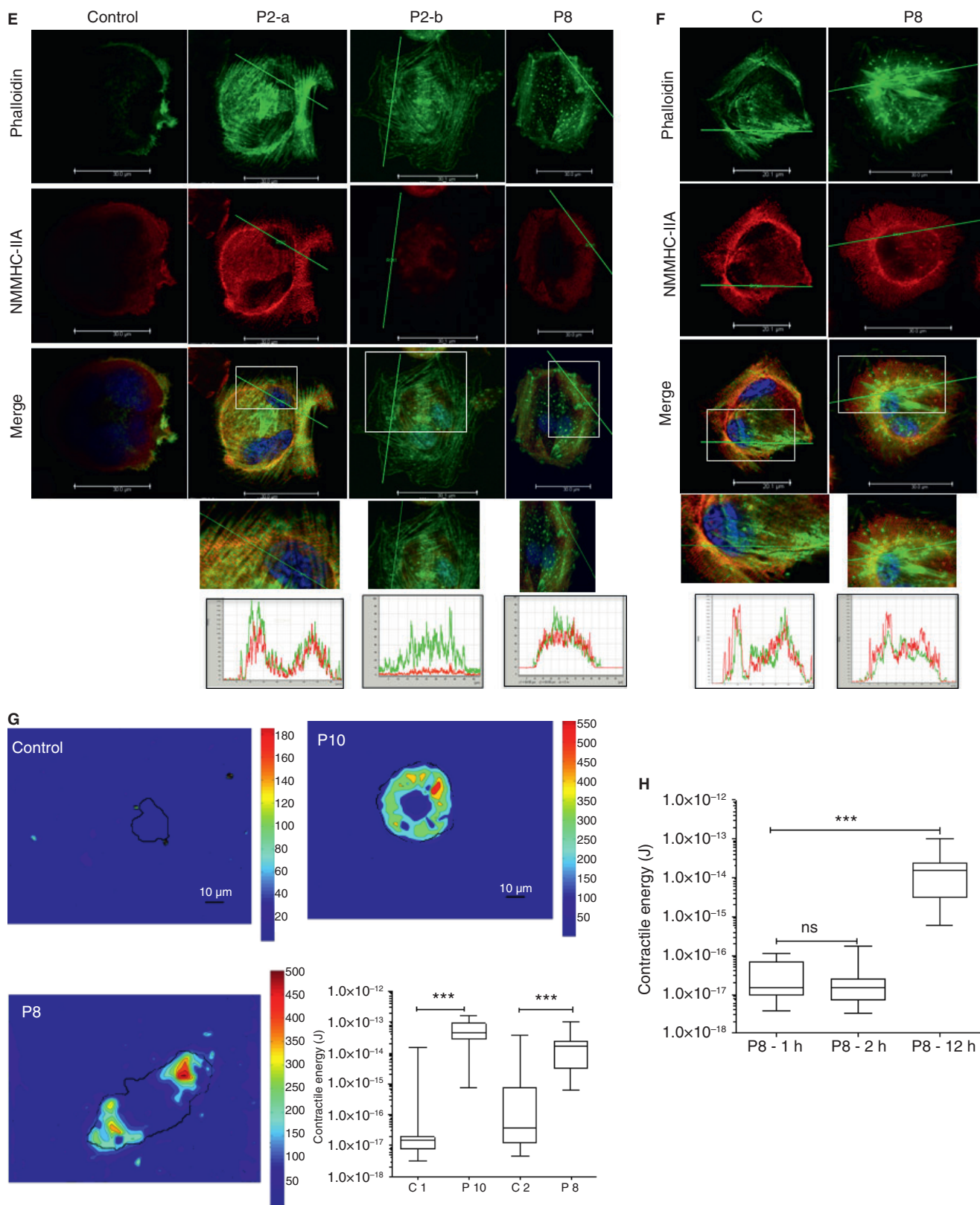


Fig. 4b. Continued.

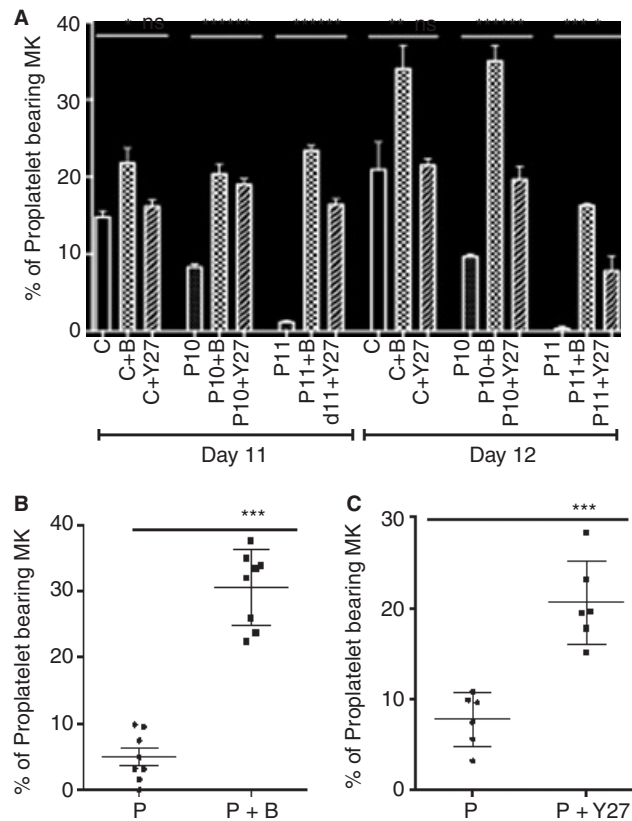


Fig. 5. Rescue of proplatelet formation by blebbistatin or a ROCK inhibitor, Y27632. Blebbistatin (B, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) or Y27632 (Y27, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were added at day 10 of culture and proplatelets were scored as described at days 11 and 12. DMSO vehicle was added to control. (A) Time course study. Blebbistatin and Y27632 treatment increased PPF in P10 (coiled-coil domain) and P11 (head domains) $*P < 0.03$; $**P < 0.005$; $***P < 0.0005$. (B) PPF studies from eight patients treated at day 10 with blebbistatin and scored at day 12 of culture (P1, P2, P3, P4, P7, P8, P10 and P11); (C) PPF from six patients (P2, P3, P4, P5, P10 and P11) treated at day 10 with Y27632 and PPF scored at day 12 of culture. $***P < 0.0005$; $**P < 0.005$.

in bone marrow samples (Fig. 6C); that is, a disorganized α -granule distribution with areas enriched with an abnormally concentrated DMS and others areas enriched in granules. Blebbistatin treatment increased PPF in cultured control MKs, with large and often branched extensions (Fig. 6D-b), while in cultured MYH9-RD MKs an important redistribution of the cytoplasm and DMS to form proplatelets was observed (Fig. 6D-d,e), with frequently quite broad extensions and branched structures with swellings at their tips. These extensions showed a relatively normal internal morphology with a large number of α -granules, although domains enriched in vacuoles sometimes could be seen. Globally the DMS was more dilated. In contrast, untreated MYH9-RD MKs appeared blocked in their maturation, retaining a round shape with limited PPF (Fig. 6D-c).

Discussion

In this study performed on a group of 11 patients with MYH9-RD MKs (Table S1), we have shown for the first time that MKs, whatever their type of mutation, display an *in vitro* defect in proplatelet formation in suspension

cultures. This abnormality was associated with an increased spreading on polylysine and fibronectin and actin disorganization. Surprisingly, MYH9-RD MKs exhibited increased contractile forces after spreading. Interestingly, blebbistatin, an inhibitor of myosin II and ROCK, corrected the proplatelet formation defect and favored the deployment of MYH9-RD MK membranes into extensions, an unexpected result in a disorder considered up to now to result from an MYH9 deficiency.

The precise mechanisms responsible for the MYH9-RD macrothrombocytopenia remain a controversial issue, but have been clearly assigned to an abnormal PPF for which two opposing mechanisms have been proposed. The first, based on the results observed with *myh9* KO MKs derived from murine ES cells or from *myh9*^{flox/flox-pf4-Cre} mice, suggests that PPF is increased, but does not take place in the marrow sinusoids due to a defective suppression by collagen I and an abnormal chemotactic response to SDF-1 [5,6,21,32]. The second mechanism proposes a decreased and abnormal PPF leading to a reduced platelet production and is based on results obtained with KI mice where the *myh9* gene sequence was mutated [25].

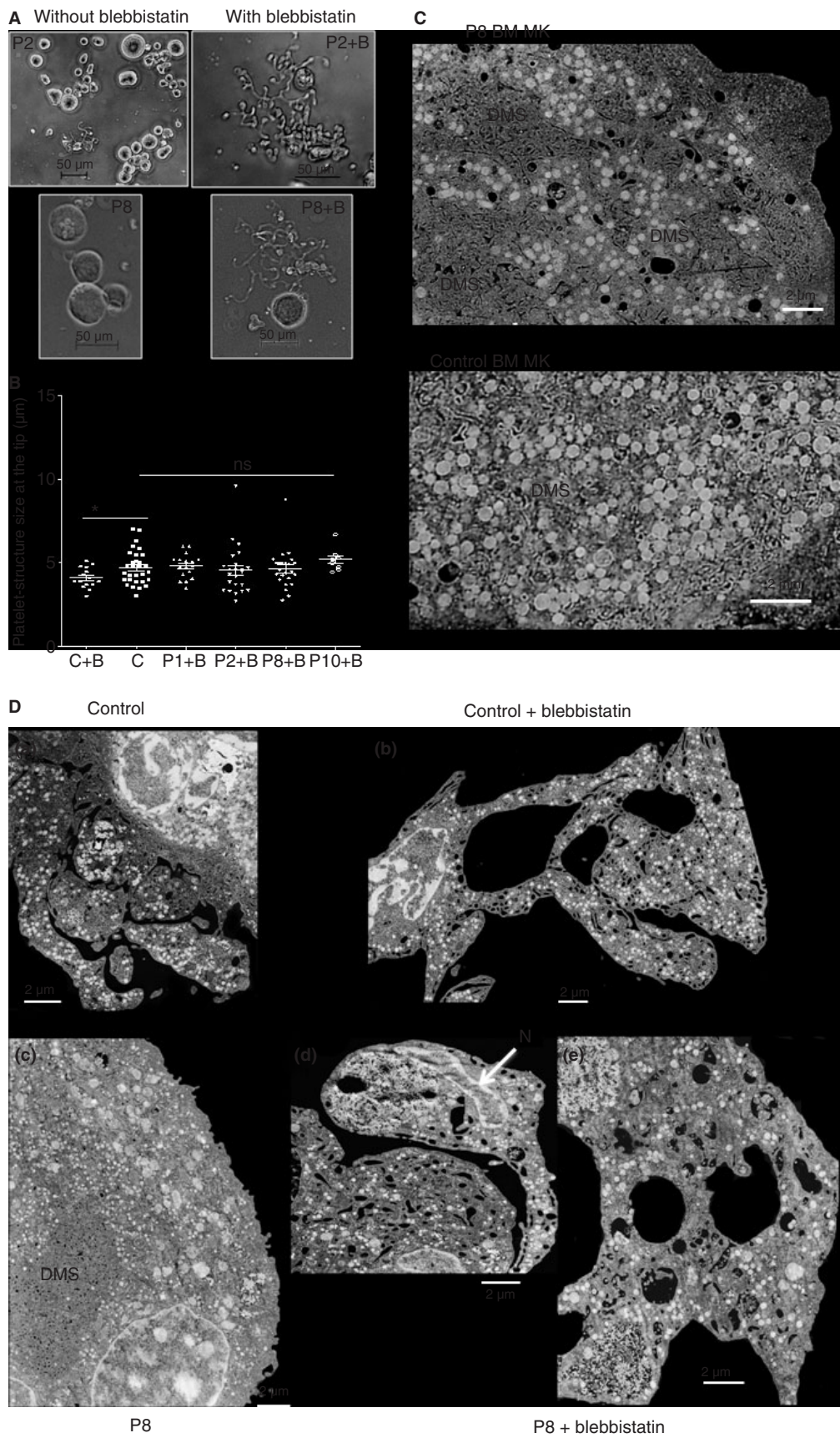


Fig. 6. Ultrastructural studies of bone marrow and cultured MKs. (A) Image taken from inverted microscope showing a typical untreated MK from P8 and P2 that did not form proplatelets. Blebbistatin treatment rescues the PPF. Normal thin, long, branched proplatelets and platelet-like structures at the tip of proplatelets were observed in MKs of the two patients. (B) Blebbistatin normalized the platelet-like structure at the tip of the proplatelet of patient MKs. Platelet-structure size was measured using the AxioVision software (Zeiss). (C) In contrast to control bone marrow MK, EM studies of P8 bone marrow MK showed an abnormal repartition of DMS and α granules. (D) EM analysis of cultured control MK (a, b) or MYH9-RD cultured MK (P8) (c, d, e) examined in the absence (a, c) or after incubation with blebbistatin (b, d, e). Control MKs at day 12 formed numerous extensions containing well-distributed granules, as illustrated in (A). When incubated with blebbistatin the number of proplatelet-like structures was increased (B). These were often branched; nevertheless, the distribution of granules and internal membranes remained homogeneous. In contrast, MKs from P8 showed few signs of PPF at day 12 and a large number of the MKs retained a round shape with zones of hyperconcentrated abnormal DMS, separated from other domains enriched in granules (C). With blebbistatin incubation, this MK is deformed and a broad extension containing granules and membranes is observed as well as a part of a nucleus (N). (E) Numerous cytoplasmic extensions are observed (P8, right panel).

In the present study, we demonstrated that MKs generated from MYH9-RD patients have a marked decrease in PPF with thick elongations similar to those described in KI mice [25]. This was observed for 11 MYH9-RD patients, some with mutations in the head motor while for others the mutations were in the coiled-coil domain. All of them showed a macrothrombocytopenia with or without associated malformations and with or without decreased levels of total MYH9 in MKs. Mutants in the motor domain with a nearly complete decrease in ATPase activity have previously been proposed to act through haploinsufficiency whereas those affecting the coiled-coil tail were said to act as abnormal functioning mutants [33]. However, in their study a validated dominant negative form of MYH9 did not decrease but rather increased PPF. In mice, a complete deletion of *myh9* gives a deficit in PPF in cultured MK suspensions [5,21] and in explant cultures [34]. In another study, heterozygous *MYH9* mutations gave a decreased PPF and results similar to ours when MKs from KI mice were cultured *in vitro* [25].

Our results similar to the *myh9* KI strongly suggest that mutants have acquired new functions. Indeed, we observed a profound defect in PPF associated with an abnormal distribution of the actomyosin cytoskeleton in the MK cytoplasm. In addition, an increase in MKs spreading on polylysine and even more on fibronectin was observed, as described on collagen for Dami cells transfected with different *MYH9* mutants [6].

Furthermore, for the first time we have demonstrated that *MYH9* mutations cause a profound but delayed change in contractile forces. Mutations in both the motor and coiled-coil domains did not affect the contractile forces during the first 2 hours of adhesion on both fibronectin and collagen substrates (data not shown). This may explain why the initial adhesion is not inhibited and spreading was increased. This spreading, as previously shown for endothelial cells, will subsequently favor the increase in mechanical forces [35]. After 12 h adhesion on fibronectin we indeed observed a huge increase in contractile force in MKs from patients in comparison to control MKs. This change was associated with the formation of stress fibers. In all previously described cellular models, such traction forces are mediated by the actomyosin network, particularly by MYH9, and are abolished by blebbistatin [36]. Our results demonstrate that MYH9-RD is

related more to an excess of actomyosin contractility than to a pure loss of function. This is in line with the previous demonstration in other models that *MYH9* deletion in the tail increased the myosin immobile fraction with an over-assembly and increased actomyosin contractility [33].

In our traction assay we measured all the contractile forces transmitted to a substrate, but this does not exclude that some cortical forces in the absence of a substrate might be altered. The marked defect in clot retraction observed in KI mice with the R702C mutation [25] as well as in *myh9* KO mice [22] and in other *MYH9* patients [37] (and P. Nurden, personal results) might be related to differences between the role of myosin II in MKs and in platelets, but might also occur because clot retraction may involve predominantly cortical forces. The increased contractile forces in MKs adhered to a substrate together with actin network disorganization are accompanied by an abnormal MK organelle distribution and the proplatelet defect. In favor of this hypothesis, blebbistatin not only rescued the quantitative and qualitative PPF defects from MYH9-RD patient MKs to a level identical to control MKs, but also corrected the DMS deployment. In addition, proplatelets from MYH9-RD MKs became thinner with the presence of an increased number of branched structures with a normal platelet-structure size at their tips. Although blebbistatin produced a small rise in PPF from normal MKs, the massive increase in MYH9-RD was totally unexpected in a disease that has been considered as a defect in myosin IIA activity. This is in marked contrast to *myh9*-deleted MKs in which blebbistatin did not rescue PPF in explant cultures [34]. In contrast, both in mouse and human models, ROCK inhibitors increased PPF, suggesting that ROCK may act on PPF in a myosin II-dependent manner by inhibiting stress fiber formation and in an independent manner in *myh9*-deleted MKs [34].

Thus, our data confirm that decreasing myosin activity corrects the abnormalities of MYH9-RD MKs, which strongly suggests that the MYH9-RD macrothrombocytopenia is due in most patients to the abnormal assembly of myosin IIA, leading to its hypercontractility in spreading MKs and in the development of MK internal membranes. These results provide evidence that treatment based on reducing platelet actomyosin contractility might be effective at least in some MYH9-RD patients.

Addendum

Y. Chen designed and performed experiments and analysed data. S. Boukour and H. Raslova performed experiments. B. Saposnik and N. Schlegel performed sequencing. R. Milloud and M. Balland performed the traction force study. P. Nurden performed the ultrastructural studies and analysed data. N. Debili designed and performed experiments and analysed data and was responsible for coordination. Y. Chen, A. Nurden, W. Vainchenker, P. Nurden and N. Debili wrote the paper.

Acknowledgements

We thank P. Rameau for flow cytometry, C. Laplace-Builhe and E. Bourrin for confocal imaging, A. Ali, A. Palazzo and O. Bluteau for their help in some experiments and S. Corey, E. Solary and F. Wendling for critical review of the manuscript. We thank the Genethon (Evry, France) for sinpRRL-PGK-GFP and for sinpRRL-PGK-WPRE lentivirus vectors and Kenichi Sawada (Akita University Graduate School of Medicine, Japan) for pEGFP-ARF296. This study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by grants from la Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) (Equipe labellisée 2012, HR) and from the Agence Nationale de la Recherche (ANR blanc, WV; ANR-08-GENO-028-03, AN) and GIS-Maladies Rares (PN, HR). ND, RF, HR and WV received a contrat d'Interface from AP-HP-INSERM (HR and RF), from IGR-INSERM (WV) and from CHU Bordeaux (ND).

Disclosure of Conflict of Interest

Y. Chen was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. S. Boukour was supported by a post-doctoral fellowship from ANR.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Immuno-confocal analysis of VWF distribution within MYH9-RD MKs.

Table S1. Analysis performed for each patient.

References

- Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J Thromb Haemost* 2009; **7**(Suppl 1): 227–34.
- Italiano JE Jr, Patel-Hett S, Hartwig JH. Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost* 2007; **5**(Suppl 1): 18–23.
- Cramer EM, Norol F, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Masse JM, Debili N. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood* 1997; **89**: 2336–46.
- Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999; **147**: 1299–312.
- Chen Z, Naveiras O, Balduini A, Mammoto A, Conti MA, Adelstein RS, Ingber D, Daley GQ, Shivdasani RA. The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood* 2007; **110**: 171–9.
- Pecci A, Bozzi V, Panza E, Barozzi S, Gruppi C, Seri M, Balduini CL. Mutations responsible for MYH9-related thrombocytopenia impair SDF-1-driven migration of megakaryoblastic cells. *Thromb Haemost* 2011; **106**: 693–704.
- Chang Y, Aurade F, Larbret F, Zhang Y, Le Couedic JP, Momeux L, Larghero J, Bertoglio J, Louache F, Cramer E, Vainchenker W, Debili N. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood* 2007; **109**: 4229–36.
- Schulze H, Korpel M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 2006; **107**: 3868–75.
- Thon JN, Macleod H, Begonja AJ, Zhu J, Lee KC, Mogilner A, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun* 2012; **3**: 852.
- Lordier L, Bluteau D, Jalil A, Legrand C, Pan J, Rameau P, Jouni D, Bluteau O, Mercher T, Leon C, Gachet C, Debili N, Vainchenker W, Raslova H, Chang Y. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun* 2012; **3**: 717.
- Murakami N, Mehta P, Elzinga M. Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform-specific synthetic peptides. *FEBS Lett* 1991; **288**: 247.
- Shin JW, Swift J, Spinler KR, Discher DE. Myosin-II inhibition and soft 2D matrix maximize multinucleation and cellular projections typical of platelet-producing megakaryocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 11458–63.
- Kelley MJ, Jawien W, Ortel TL, Korczak JF. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat Genet* 2000; **26**: 106–8.
- Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Savino M, Del Vecchio M, d'Apolito M, Iolascon A, Zelante LL, Savoia A, Balduini CL, Noris P, Magrini U, Belletti S, Heath KE, Babcock M, et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 2000; **26**: 103–5.
- Althaus K, Greinacher A. MYH9-related platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2009; **35**: 189–203.
- Kunishima S, Saito H. Advances in the understanding of MYH9 disorders. *Curr Opin Hematol* 2010; **17**: 405–10.
- Savoia A, Balduini CL. MYH9-Related Disorders. 2008 Nov 20 [Updated 2011 Apr 5]. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, Smith RJH, Stephens K. *GeneReviews™ [Internet]*. Seattle, WA: University of Washington, 1993–2013. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2689/>. Accessed 05 April 2011.
- Balduini CL, Pecci A, Savoia A. Recent advances in the understanding and management of MYH9-related inherited thrombocytopenias. *Br J Haematol* 2011; **154**: 161–74.
- Pecci A, Panza E, De Rocco D, Pujol-Moix N, Girotto G, Podda L, Paparo C, Bozzi V, Pastore A, Balduini CL, Seri M, Savoia A. MYH9 related disease: four novel mutations of the

- tail domain of myosin-9 correlating with a mild clinical phenotype. *Eur J Haematol* 2010; **84**: 291–7.
- 20 Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N, Klersy C, Di Bari F, Bozzi V, Gresele P, Lethagen S, Fabris F, Dufour C, Granata A, Doubek M, Pecoraro C, Koivisto PA, Heller PG, Iolascon A, Alvisi P, Schwabe D, De Candia E, Rocca B, *et al.* Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat* 2008; **29**: 409–17.
 - 21 Eckly A, Strassel C, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C, Leon C. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood* 2009; **113**: 3182–9.
 - 22 Leon C, Eckly A, Hechler B, Aleil B, Freund M, Ravanat C, Jourdain M, Nonne C, Weber J, Tiedt R, Gratacap MP, Severin S, Cazenave JP, Lanza F, Skoda R, Gachet C. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* 2007; **110**: 3183–91.
 - 23 Kunishima S, Hamaguchi M, Saito H. Differential expression of wild-type and mutant NMMHC-IIA polypeptides in blood cells suggests cell-specific regulation mechanisms in MYH9 disorders. *Blood* 2008; **111**: 3015–23.
 - 24 Franke JD, Montague RA, Rickoll WL, Kiehart DP. An MYH9 human disease model in flies: site-directed mutagenesis of the *Drosophila* non-muscle myosin II results in hypomorphic alleles with dominant character. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 3160–73.
 - 25 Zhang Y, Conti MA, Malide D, Dong F, Wang A, Shmist YA, Liu C, Zerfas P, Daniels MP, Chan CC, Kozin E, Kachar B, Kelley MJ, Kopp JB, Adelstein RS. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood* 2012; **119**: 238–50.
 - 26 Gilles L, Bluteau D, Boukour S, Chang Y, Zhang Y, Robert T, Dessen P, Debili N, Bernard OA, Vainchenker W, Raslova H. MAL/SRF complex is involved in platelet formation and megakaryocyte migration by regulating MYL9 (MLC2) and MMP9. *Blood* 2009; **114**: 4221–32.
 - 27 Ubukawa K, Guo YM, Takahashi M, Hirokawa M, Michishita Y, Nara M, Tagawa H, Takahashi N, Komatsuda A, Nunomura W, Takakuwa Y, Sawada K. Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood* 2012; **119**: 1036–44.
 - 28 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; **126**: 677–89.
 - 29 Tseng Q, Wang I, Duchemin-Pelletier E, Azoune A, Carpi N, Gao J, Filhol O, Piel M, Thery M, Balland M. A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab Chip* 2011; **11**: 2231–40.
 - 30 Hu A, Wang F, Sellers JR. Mutations in human nonmuscle myosin IIA found in patients with May-Hegglin anomaly and Fechtner syndrome result in impaired enzymatic function. *J Biol Chem* 2002; **277**: 46512–7.
 - 31 Ikebe M, Komatsu S, Woodhead JL, Mabuchi K, Ikebe R, Saito J, Craig R, Higashihara M. The tip of the coiled-coil rod determines the filament formation of smooth muscle and nonmuscle myosin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 30293–300.
 - 32 Pecci A, Malara A, Badalucco S, Bozzi V, Torti M, Balduini CL, Balduini A. Megakaryocytes of patients with MYH9-related thrombocytopenia present an altered proplatelet formation. *Thromb Haemost* 2009; **102**: 90–6.
 - 33 Breckenridge MT, Dulyaninova NG, Egelhoff TT. Multiple regulatory steps control mammalian nonmuscle myosin II assembly in live cells. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 338–47.
 - 34 Eckly A, Rinckel JY, Laeuffer P, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C, Leon C. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2243–51.
 - 35 Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **307**: 355–61.
 - 36 Cai Y, Biais N, Giannone G, Tanase M, Jiang G, Hofman JM, Wiggins CH, Silberzan P, Buguin A, Ladoux B, Sheetz MP. Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J* 2006; **91**: 3907–20.
 - 37 Godwin HA, Ginsburg AD. May-Hegglin anomaly: a defect in megakaryocyte fragmentation? *Br J Haematol* 1974; **26**: 117–28.

Chapitre VI. Conclusion générale

En médecine, la tumeur désigne le dérèglement bénin ou malin de la croissance cellulaire conduisant à l'augmentation du volume d'un tissu. Ces tumeurs sont principalement accompagnées d'une augmentation de la rigidité des tissus, liée elle même à un accroissement de la contractilité cellulaire. Les tumeurs malignes entraînent un dysfonctionnement de l'organe touché et sont les causes du cancer. De nombreuses études ont montré l'implication de l'intégrine $\beta 3$ dans les cancers (Danhier et al, 2012). En effet, l'intégrine $\beta 3$ est très largement exprimée dans les échantillons de biopsie des vaisseaux sanguins tumorales humain alors qu'elle ne l'est pas dans les vaisseaux des tissus sains. Elle est également impliquée dans les tumeurs du pancréas, dans le cancer de la prostate ainsi que dans le cancer du sein, sa sur-expression est corrélée avec la métastase osseuse, et traduit la prolifération des tumeurs et sert donc de marqueur dans les chimiothérapies contre le cancer du sein. Par conséquent l'étude du rôle de l'intégrine $\beta 3$ dans la contractilité cellulaire apparaît essentielle, celle-ci agissant comme un déclencheur pour la survie de la cellule.

Ce travail de recherche, principalement consacrée à l'étude de la génération de forces cellulaires, nous fournit un nouvel éclairage sur les mécanismes fondamentaux du processus de mécanotransduction en faisant le lien entre contractilité cellulaire et expression de protéines adhésives. En utilisant la technique de microscopie à traction de forces nous avons ainsi pu explorer le fonctionnement de l'adhésion cellulaire et plus précisément le rôle respectif des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la génération de forces de traction mais nous avons pu également nous servir de cet outil pour opérer des diagnostics médicaux de différentes pathologies telle que la thrombocytemie ou le défaut de formation vasculaire.

Le résultat majeur de ces travaux, utilisant une approche génétique combinée à la microscopie à traction de forces, montre que l'intégrine $\beta 1$ est l'effecteur principal de la génération des forces de traction tandis que l'intégrine $\beta 3$ joue le rôle de régulateur spatio-temporel de l'énergie contractile en modulant la distribution spatiale et l'état d'activation de l'intégrine $\beta 1$. L'étude des différentes mutations de la partie cytoplasmique de $\beta 3$ nous a permis de montrer que cette régulation biomécanique implique la phosphorylation du site d'interaction avec le co-activateurs d'intégrines, la kindline. Ce travail de recherche nous démontre pour la première fois la coopération dynamique entre les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans le maintien de la stabilité de l'activité contractile de la cellule en opérant une analyse combinée de l'énergie et du moment contractile, essentielle pour intégrer l'activité contractile globale de la cellule. Néanmoins, le fonctionnement exact de ces mécanismes ainsi que les cascades de signalisation impliquées dans cette régulation restent à être élucidés.

Par ailleurs, l'activité contractile de la cellule est impliquée dans divers processus physiologique tels que la morphogenèse ou encore la coagulation sanguine déclenchée par les thrombocytes (la thrombocytose qui par ailleurs, a été la première maladie démontrant l'implication des intégrines).

Dans le cadre d'une première collaboration avec l'équipe du Pr. Holmgren, nous avons pu montrer que cette contractilité cellulaire est impliquée dans le développement vasculaire de l'organisme et plus précisément qu'elle est nécessaire à l'extension de la lumière aortique via une protéine spécifique (amotl2) qui relie les fibres contractiles aux VE-cadhérines.

D'autre part nous avons également pu démontrer, en collaboration avec le Dr Debili, que la contractilité des mégacaryocytes était essentielle pour former les proplaquettes impliquées dans l'hémostase. Le défaut de formation des

proplaquettes dépendant du système actomyosine dans le cas du Syndrome MYH9.

Par conséquent, l'analyse à l'échelle cellulaire des forces impliquées devraient permettre de mieux cibler les stratégies thérapeutiques des traitements tumoraux ou des Syndromes tel que la thrombocytose.

Abréviations

AFM: Atomic Force Microscopy

Ec: Energie contractile

FA: Focale Adhesion

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FAK: Focale Adhesion Kinase

FTTC: Fast Fourier Transform Cytometry

GTP: Guanosine Tri-Phosphate

GFP: Green Fluorescent Protein

ICAP-1: Integrin Cytoplasmic domain Associated Protein-1

MEC: Matrice Extra-Cellulaire

MEF: Mouse Embryonic Fibroblast

MK: MegaKaryocytes

Mu: Moment contractile

PAA: PolyAcrylAmide

PBS: Phosphate Buffer Solution

PIV: Particle Imaging Velocimetry

PP: ProPlatelets

PPF: ProPlatelets Formation

RIAM: Rap1-GTP-Interacting Adaptor Molecule

ROCK: Rho-associated, coiled-coil containing protein Kinase ou Rho Kinase

SPT: Single Particle Tracking

TFM: Traction Force Microscopy

VASP: VAsodilatator Stimulated Phosphoprotein

VE: Vascular Endothelial

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WT: Wild-Type

Annexes

A. PROTOCOLES DE PREPARATION D'HYDROGEL DE POLYACRYLAMIDE

1. Traitement des lamelles de verre

Matériels

- 99.9% éthanol
- 10% acide acétique
- Bind silane (Plus one; code no - 17-1330-01)

Procédure

1. Solution préparé dans 99.9% d'éthanol en ajoutant 3.2 % d'acide acétique et 0.38% de bind silane puis mixer le tout.
2. 100µl de solution utilisé pour couvrir des lamelles de 20x20mm.
3. Eponger le trop plein de liquide sur la lamelle.
4. Laisser sécher 5 min.
5. Les lamelles traiter peuvent être conserver quelques mois à température ambiante.

2. Fabrication des hydrogels

Matériels

Tous les produits chimiques proviennent de Sigma.

- Acrylamide solution.
- N,N-methylene bis-acrylamide solution.
- Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 98 % Ammonium persulfate (APS)
- DPBS, sans Calcium et Magnésium [PAA Laboratories (Cat no H15-002)]
- Fibronectin from bovine plasma
- 10 % APS préparé dans l'eau déionisée
- 0.2 M EDC préparé dans l'eau déionisée
- 0.15 M NHS préparé dans l'eau déionisée
- Billes fluorescentes 200nm (Bang Lab ou Invitrogen)

Procédure

- Bien nettoyer le masque de quartz à l'eau chaude savonneuse, puis frotter à l'aide de papier doux à l'isopropanol.
- Recouvrir le masque de n-hexane, éponger le trop plein.
- Préparer 168 μ L de premix (solution d'acrylamide, bis-acrylamide et DPBS), puis ajouter 1 μ L de billes fluorescentes: passer au sonicateur 3 min.
- Ajouter 1 μ L de TEMED et 1 μ L d'APS: vortex

- Déposer une goutte de 46 μ L (pour une lamelle de 36mm de diamètre) sur le masque.
- Déposer la lamelle dessus, recouvrir avec un cache pour éviter l'évaporation et le photo-blanchiment et laisser polymériser pendant 50min à température ambiante.
- Une fois la polymérisation finit, illuminer le masque avec le gel aux UV profonds (180nm).

Fonctionnalisation de la surface du gel avec des protéines

- Sur du parafilm préalablement étalé sur la table, déposer une goutte de 100 μ L de mélange NHS/EDC puis recouvrir la goutte avec la lamelle.
- Retourner la lamelle toutes les 5 min pendant 15-20min.
- Pendant ce temps préparer la solution de protéines (solution contenant de la fibronectine dilué dans de l'HEPES 10mM pH 8,5)
- Déposer une goutte de 100 μ L de solution contenant les protéine sur le parafilm puis recouvrir la goutte avec la lamelle.
- Incuber pendant 50 min à température ambiante.

B. CULTURE CELLULAIRE

1. Culture cellulaire classique

Les fibroblastes embryonnaire de souris (MEF) ont été confectionnées par le Dr. Olivier Destaing de l'institut Albert Bonniot, Grenoble.

Les MEFs $\beta 3^{+/+}$ et $\beta 3^{-/-}$ ont été généreusement donnés par le Dr. Hynes (The David H. Koch Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA). Les MEFs isolées de souris $\beta 1^{loxP/loxP}$ ont été généreusement données par le Prof. Fassler (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsreid, Germany).

Les MEFs sont cultivées dans du High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) agrémenté avec 10 % Fetal calf serum (FCS) et 0.2 % penicillin streptomycine. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C à 5% de CO₂.

Plasmides

- L'adénovirus Cre a été acheté chez *Gene Transfer Vecteur Core* de l'université d'Iowa (Etats-Unis).
- Les vecteurs rétrovirus pBabe-mouse $\beta 3$ -GFP, pBabe-mouse $\beta 3^{W740A}$ -GFP, pBabe-mouse $\beta 3^{D748A,E751A}$ -GFP, pBabe-mouse $\beta 3^{Y772F}$ -GFP, pBabe-mouse $\beta 3^{Y784F}$ -GFP and pBabe-mouse $\beta 3^{R785stop}$ construit ont été fabriqués en utilisant le kit de mutagenèse dirigée Quickchange XL (Stratagene, La Jolla, CA).

2. Culture cellulaire sur hydrogel

1. Retirer le milieu de la boîte de pétri
2. Rincer les cellules avec 1mL de trypsine puis retirer
3. Ajouter 1mL de trypsine et incubé à 37°C
4. Une fois les cellules détachées ajouter 4mL de milieu frais
5. Déposer environ 70 000 cellule/mL sur le gel puis incubé à 37°C pendant une nuit
6. Lorsque les cellules sont bien étalées, mettre la lamelle contenant le gels dans la chambre d'observation (POC-R Zeiss) puis ajouter 2mL de milieu CO2 indépendant (de préférence sans rouge de phénol) ou suivre le protocole de fixation pour un marquage ultérieur.
7. Installer la chambre d'observation sous le microscope (TFM).

C. IMMUNOMARQUAGES

1. Fixation des cellules

- A partir de l'étape 6 de la culture cellulaire sur hydrogel (Annexe B), ajouter 1mL de PFA 4%
- Laisser à température ambiante (RT) pendant 10-15min
- Rincer 2 fois avec du PBS 1x

2. Marquage des intégrines $\beta 1$ activées

- Solution immunofluorescence (IF): PBS+BSA 3%
- Ajouter anticorps primaire 9EG7 Rat (1/1000) à la solution d'IF.
- 50 μ L par lamelle sur parafilm: 1h @ RT
- Rincer 3x5min au PBS 1x
- Solution d'IF + Triton 0,3%+ AntiRat 488 (1/1000e)
- 50 μ L par lamelle sur parafilm: 40min @ RT
- Rincer 4x5min au PBS 1x
- Monter les lamelles avec Moewiol.

3. Double marquage kindline/Taline

- Solution immunofluorescence non perméabilisante(IF): PBS+BSA 3%
- Ajouter l'anticorps primaire Kindline2 de Souris (1/1000) + Taline Lapin J61 (1/400) à la solution d'IF+ Taline Lapin J61 (1/400)
- 50µL par lamelle sur parafilm: 1h @ RT
- Rincer 3x5min au PBS 1x
- Solution d'IF + Triton 0,3%+ AntiSouris 546 (1/1000e)+ AntiLapin 647(1/1000e)
- 50µL par lamelle sur parafilm: 40min @ RT
- Rincer 4x5min au PBS 1x
- Monter les lamelles avec Moviol.

4. Marquage paxilline ou vinculine

- Marquage Paxilline sur MEF B1:
- Anticorps laire: PBS+BSA+Triton+Pax Mouse (1/200e)
- Anticorps llaire: PBS+BSA+AntiMouse Ritc (1/1000e)
- Marquage Paxilline sur MEF B3 LAR:
- Anticorps laire: PBS+BSA+Triton+Pax Rab (1/250e)
- Anticorps llaire: PBS+BSA+AntiMouse Ritc (1/500e)

Bibliographie

Alberts B, A. Johnson and J. Lewis (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition ; Garland Science.

Albiges-Rizo C, O. Destaing, B. Fourcade, E. Planus and M.R. Block (2009). « Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions ». *J Cell Sci* 122, 3037-3049. doi: 10.1242/jcs.052704

Althaus, K. and A. Greinacher (2009). «MYH9-related platelet disorders. » *Seminars in thrombosis and hemostasis* 35: 189-203.

Ananthakrishnan R, and A. Ehrlicher (2007). « The Forces Behind Cell Movement ». *International Journal of Biological Sciences*; 3(5): 303–317. PMID: PMC1893118

Anthi, N. J., K. L. Wegener, F. Ye, C. Kim, B. T. Gault, E. D. Lowe, I. Vakonakis, N. Bate, D. R. Critchley, M. H. Ginsberg and I. D. Campbell (2009). «The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction.» *The EMBO journal* 28: 3623-3632.

Anthi, N.J and I. Campbell (2011). « The tail of integrins activation ». *Trends in Biochemical Sciences* 36(4):191-8.

Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, a. Bershadsky, L. Addadi and B. Geiger (2001). «Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. » *Nature cell biology* 3: 466-472.

Bazzoni, G. and M. E. Hemler (1998). «Are changes in integrin affinity and.conformation overemphasised» *Trends Biochemical Sciences*. 23(1):30-4.

Beningo, K. a., M. Dembo, I. Kaverina, J. V. Small and Y. L. Wang (2001). «Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. » *The Journal of cell biology* 153: 881-888.

Bershadsky, A. D., N. Q. Balaban and B. Geiger (2003). «Adhesion-dependent cell mechanosensitivity» *Annual review of cell and developmental biology* 19: 677-695.

Bhattacharya, R., A. M. Gonzalez, P. J. Debiase, H. E. Trejo, R. D. Goldman, F. W. Flitney and J. C. R. Jones (2009). «Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength. » *Journal of cell science* 122: 1390-1400.

Bulina, M. E., D. M. Chudakov, O. V. Britanova, Y. G. Yanushevich, D. B. Staroverov, T. V. Chepurnykh, E. M. Merzlyak, M. a. Shkrob, S. Lukyanov and K. a. Lukyanov (2006). «A genetically encoded photosensitizer.» *Nature biotechnology* 24: 95-99.

Burgstaller, G., M. Gregor, L. Winter and G. Wiche (2010). «Keeping the Vimentin Network under Control : Cell – Matrix Adhesion – associated Plectin 1f Affects Cell Shape and Polarity of Fibroblasts.» *Molecular Biology of the Cell*. 21(19): 3362–3375.

Butcher, D. T., T. Alliston and V. M. Weaver (2009). «A tense situation: forcing tumour progression.» *Nature reviews. Cancer* 9: 108-122.

Butler, J. P., I. M. Tolić-Nørrelykke, B. Fabry and J. J. Fredberg (2002). «Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings» *American journal of physiology. Cell physiology* 282: C595-605.

Calderwood, D. a. (2004). «Talin controls integrin activation.» *Biochemical Society transactions* 32: 434-437.

Calderwood, D. a., I. D. Campbell and D. R. Critchley (2013). «Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion.» *Nature reviews. Molecular cell biology* 14: 503-517.

Calderwood, D. a., Y. Fujioka, J. M. de Pereda, B. García-Alvarez, T. Nakamoto, B. Margolis, C. J. McGlade, R. C. Liddington and M. H. Ginsberg (2003). «Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2272-2277.

Cavalcanti-Adam E.A., T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J.P Spatz (2007). « Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligand. » *Biophysical Journal*. 92(8): 2964–2974.

Carpentier P, Violot S, Blanchoin L, Bourgeois D., (2009). « Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed ». *FEBS Letters* 583:2839-2842

Chen, C. S. (2008). «Mechanotransduction - a field pulling together?» *Journal of cell science* 121: 3285-3292.

Chen, C. S., J. L. Alonso, E. Ostuni, G. M. Whitesides and D. E. Ingber (2003). «Cell shape provides global control of focal adhesion assembly.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307: 355-361.

Chen, Y., S. Boukour, R. Milloud, R. Favier, B. Saposnik, N. Schlegel, a. Nurden, H. Raslova, W. Vainchenker, M. Balland, P. Nurden and N. Debili (2013). «The abnormal proplatelet formation in MYH9-related macrothrombocytopenia results from an increased actomyosin contractility and is rescued by myosin IIA inhibition.» *Journal of thrombosis and hemostasis* : JTH 11: 2163-2175.

Chu, Y.-S., W. a. Thomas, O. Eder, F. Pincet, E. Perez, J. P. Thiery and S. Dufour (2004). «Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42.» *The Journal of cell biology* 167: 1183-1194.

Coulombe, P.A., Ma, L.L., Yamada, S. and Warwersik, M. (2001). Intermediate filaments at a glance. *Journal Cell Science*, 114(24):4345-4347.

Danen, E. H., J. van Rheenen, W. Franken, S. Huveneers, P. Sonneveld, K. Jalink and A. Sonnenberg (2005). «Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway.» *Journal of Cell Biology* 169(3): 515-526.

Dembo, M., T. Oliver, a. Ishihara and K. Jacobson (1996). «Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method.» *Biophysical journal* 70: 2008-2022.

Dembo, M. and Y. L. Wang (1999). «Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts.» *Biophysical journal* 76: 2307-2316.

Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo and M. R. Block (2010). « $\beta 1A$ integrin is a master regulator of invadosome organization and function.» *Molecular biology of the cell* 21: 4108-4119.

Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2006). «Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.» *Cell* 126: 677-689.

Fassler, R. and M. Meyer (1995). «Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice.» *Genes & Development* 9: 1896-1908.

Faurobert, E., C. Rome, J. Lisowska, S. Manet-Dupé, G. Bouliday, M. Malbouyres, M. Balland, A.-P. Bouin, M. Kéramidas, D. Bouvard, J.-L. Coll, F. Ruggiero, E. Tournier-Lasserre and C. Albiges-Rizo (2013). «CCM1-ICAP-1 complex controls β 1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling.» *The Journal of cell biology* 202: 545-561.

Foty, R. a. and M. S. Steinberg (2005). «The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation.» *Developmental biology* 278: 255-263.

Galbraith and Sheetz (1997). « Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes » *Trends in Cell Biology* , Volume 8 , Issue 2 , 51 - 54

Giannone, G., Jiang, G., Sutton, D.H., Critchley, D.R., Sheetz, M.P. (2003). « Talin 1 is critical for force-dependant reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation » *The Journal of cell biology* 163(2):409-19.

Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B , (2006). « Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment » *The Journal of cell biology* 172(2): 259-68

Goldschmidt, M. E., K. J. McLeod and W. R. Taylor (2001). «Integrin-Mediated Mechanotransduction in Vascular Smooth Muscle Cells : Frequency and Force Response Characteristics.» *Circulation Research* 88: 674-680.

Gulino, D., E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, M.-o. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, M. Alemany, J. B. Chem, B. Morand and T. Vernet (1998). «Alteration of Endothelial Cell Monolayer Integrity Triggers Resynthesis of Vascular Endothelium Cadherin Alteration of Endothelial Cell Monolayer Integrity Triggers Resynthesis of Vascular Endothelium Cadherin. » *Journal Biological Chemistry* 273:29786-29793.

Han, S.J., Ting, L.H., Bielawski, K.S., Rodriguez, M.L., Sniadecki, N.J. (2012) Decoupling Substrate Stiffness, Spread Area, and Micropost Density: A Close Spatial Relationship Between Traction Forces and Focal Adhesions. *Biophysical journal*. 103(4): 640-8

David S. Harburger and David A. Calderwood (2009). « Integrin signalling at a glance ». *Journal of Cell Science* 122, 159-163.

Harris, A. K., P. Wild, and D. Stopak.(1980) « Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion » *Science* 208(4440):177179

Herbert S.P. and D.Y. Stainier (2011) « Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis ». *Nature Review Molecular Cell Biology* 12:551–564.

Hoffman, B. D., C. Grashoff and M. a. Schwartz (2011).«Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction.» *Nature* 475: 316-323.

Hu A., F. Wang and J.R. Sellers (2002) Mutations in human nonmuscle myosin IIA found in patients with May-Hegglin anomaly and Fechtner syndrome result in impaired enzymatic function. *Journal Biological Chemistry* 277: 46512–7.

Humphries, J. D., A. Byron and M. J. Humphries (2006).«Integrin ligands at a glance.» *Journal of cell science* 119: 3901-3903.

Hynes, R.O., (2002) « Integrins Bidirectional, Allosteric Signaling Machines » *Cell* 110(6):673-87.

Ikebe M., Komatsu S., Woodhead JL., Mabuchi K., Ikebe R., Saito J., Craig R., Hogashihara M. (2001). « The tip of the coil coiled rod determines the filament formation of smooth muscle and nonmuscle myosin ». *Journal Biological Chemistry* 276(32):30293-300

Ingber DE. (2008). « Tensegrity and mechanotransduction». *Journal of Bodywork and Movement Therapies*. 12(3):198-200

Italiano, J.E., P. Lecine, R.A. Shivdasani, J.H. Hartwig (1999). « Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes » *Journal of Cell Biology* 147(6):1299-312.

Jamney, P.A., (1991). « Mechanical properties of cytoskeletal polymers ». *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 3, Issue 1, February 1991, Pages 4-11

Ladoux, B., E. Anon, M. Lambert, A. Rabodzey, P. Hersen, A. Buguin, P. Silberzan and R.-M. Mège (2010).«Strength dependence of cadherin-mediated adhesions.» *Biophysical journal* 98: 534-542.

Lampugnani M.G., A. Zanetti, F. Breviario, G. Balconi, F. Orsenigo, M. Corada, R. Spagnuolo, M. Betson, V. Braga, E. Dejana (2002). « VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. » *Molecular Biology of the Cell*. 13(4):1175-89.

Leckband, D. E., le Duc, Q., Wang, N. & de Rooij, J. (2011)« Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions ». *Current Opinion in Cell Biology*. 23, 523–530

Lecuit, T. and P.-F. Lenne (2007).«Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis.» *Nature reviews. Molecular cell biology* 8: 633-644.

Lee, H.-H., H.-C. Lee, C.-C. Chou, S. S. Hur, K. Osterday, J. C. Del Álamo, J. C. Lasheras and S. Chien (2013).«Shp2 plays a crucial role in cell structural orientation and force polarity in response to matrix rigidity.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 2840-2845.

Legate, K. R. and R. Fässler (2009).«Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails.» *Journal of cell science* 122: 187-198.

Lin, G. L., D. M. Cohen, R. A. Desai, M. T. Breckenridge, L. Gao, M. J. Humphries and C. S. Chen (2013).«Activation of beta 1 but not beta 3 integrin increases cell traction forces.» *FEBS letters* 587: 763-769.

Lopez, J. I., J. K. Mouw and V. M. Weaver (2008)« Biomechanical regulation of cell orientation and fate ». *Oncogene* 27, 6981–93.

Maiato, H, J. DeLuca, E.D. Salmon and W.C. Earnshaw (2004). « The dynamic kinetochore-microtubule interface ». *Journal of Cell Science*. 117:5461-5477.

Martel, V., C. Racaud-Sultan, S. Dupe, C. Marie, F. Paulhe, A. Galmiche, M. R. Block and C. Albiges-Rizo (2001).«Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides.» *The Journal of biological chemistry* 276: 21217-21227.

Martinez-Rico, C., F. Pincet, J.-P. Thiery and S. Dufour (2010).«Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility.» *Journal of cell science* 123: 712-722.

Maruthamuthu, V., Sabass, B., Schwarz, U.S., Gardel, M.L. (2011). « Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 21383129

Mierke, C. T., N. Bretz and P. Altevogt (2011).«Contractile forces contribute to increased glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor CD24-facilitated cancer cell invasion.» *The Journal of biological chemistry* 286: 34858-34871.

Mierke, C. T., B. Frey, M. Fellner, M. Herrmann and B. Fabry (2011).«Integrin $\alpha 5\beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces.» *Journal of cell science* 124: 369-383.

Millán J, Cain RJ, Reglero-Real N, Bigarella C, Marcos-Ramiro B, Fernandez-Martin L, Correias I, Ridley AJ « Adherens junctions connect stress fibers between adjacent endothelial cells ». *BMC Biol* 2010, 8:11.

Mogilner, a. and G. Oster (1996).«Cell motility driven by actin polymerization.» *Biophysical journal* 71: 3030-3045.

Montanez, E., S. Ussar, M. Schifferer, M. Bösl, R. Zent, M. Moser and R. Fässler (2008).«Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins.» *Genes & development* 22: 1325-1330.

Moore, S. W., P. Roca-Cusachs and M. P. Sheetz (2010).«Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing.» *Developmental cell* 19: 194-206.

Moser, M., B. Nieswandt, S. Ussar, M. Pozgajova and R. Fa (2008).«Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation.» *Nature medecin.* 14: 325-330.

Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. a. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. a. Hammer and V. M. Weaver (2005).«Tensional homeostasis and the malignant phenotype.» *Cancer cell* 8: 241-254.

Patrie, K. M. (2005). « Identification and characterization of a novel tight junction-associated family of proteins that interacts with a WW domain of MAGI-1 ». *Biochemical Biophysics Acta* 1745, 131–144

Pelham and Wang (1997). « Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25):13661-5.

Poincloux, R., O. Collin, F. Lizárraga, M. Romao, M. Debray, M. Piel and P. Chavrier (2011).«Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 1943-1948.

Pompe, T., Glorius, S., Bischoff, T., Kaufmann, M., Brenner, S., Werner, C., (2009). «Dissecting the impact of matrix anchorage and elasticity in cell adhesion ». *Biophysical Journal* Vol97: 2154-2163.

Prager-Khoutorsky, M., A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger and A. D. Bershadsky (2011). «Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing.» *Nature cell biology* 13: 1457-1465.

Puklin-Faucher, E. and M. P. Sheetz (2009). «The mechanical integrin cycle.» *Journal of Cell Science* 122: 575-575.

Rahmouni, S., A. Lindner, F. Rechenmacher, S. Neubauer, T. R. A. Sobahi, H. Kessler, E. A. Cavalcanti-Adam and J. P. Spatz (2013). «Hydrogel micropillars with integrin selective peptidomimetic functionalized nanopatterned tops: a new tool for the measurement of cell traction forces transmitted through $\alpha v \beta 3$ - or $\alpha 5 \beta 1$ -integrins.» *Advanced materials* 25: 5869-5874.

Rape, A. D., W.-H. Guo and Y.-L. Wang (2011). «The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions.» *Biomaterials* 32: 2043-2051.

Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger and a. D. Bershadsky (2001). «Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism.» *The Journal of cell biology* 153: 1175-1186.

Roca-Cusachs, P., A. del Rio, E. Puklin-Faucher, N. C. Gauthier, N. Biais and M. P. Sheetz (2013). «Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: E1361-1370.

Roca-Cusachs, P., N. C. Gauthier, A. Del Rio and M. P. Sheetz (2009). «Clustering of $\alpha 5 \beta 1$ integrins determines adhesion strength whereas $\alpha v \beta 3$ and talin enable mechanotransduction.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 16245-16250.

Roca-Cusachs, P., T. Iskratsch and M. P. Sheetz (2012). «Finding the weakest link: exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways.» *Journal of cell science* 125: 3025-3038.

Rossier, O., V. Ochteau, J.-b. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albigès-Rizo, R. Tampé, L. Cognet, D. Choquet, B. Lounis and G. Giannone (2012). «Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions.» *Nature cell biology* 14: 1057-1067.

Sabass, B., M. L. Gardel, C. M. Waterman and U. S. Schwarz (2008). «High Resolution Traction Force Microscopy Based on Experimental and Computational Advances.» *Biophysical Journal* 94: 207-220.

Saez, A., M. Ghibaudo, B. Ladoux, A. Buguin and P. Silberzan «Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat.» http://www.cnrs.fr/publications/imagesdelaphysique/couv-PDF/IdP2007/15_Saez.pdf

Sanford J. Shattil, Chungho Kim, and Mark H. Ginsberg (2010). « The final steps of integrin activation: the end game » *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(4): 288–300. doi:10.1038/nrm2871

Schiller, H. B., M.-R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C. C. Friedel, Z. Sun, A. Raducanu, K.-E. Gottschalk, M. Théry, M. Mann and R. Fässler (2013). « $\beta 1$ - and αv -class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments.» *Nature cell biology* 15: 625-636.

Schwartz, M.A., Schaller, M.D., and Ginsberg, M.H. (1995). « Integrins: emerging paradigms of signal transduction ». *Annual Review Cell. Dev. Biol.* 11, 549 –599.

Schwarz, U. S., N. Q. Balaban, D. Riveline, A. Bershadsky, B. Geiger and S. A. Safran (2002) « Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization » *Biophysical journal* 83(3) 1380–1394

Shattil S.J., K. Chungho and M. H. Ginsberg. (2010). « The final steps of integrins activation: the end game » *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(4): 288–300.

Shemesh, Tom; Bershadsky, Alexander D; Kozlov, Michael M (2012). « Physical model for self-organization of actin cytoskeleton and adhesion complexes at the cell front ». *Biophysical journal* vol. 102 (8) p. 1746-56

Staros, J.V., Wright RW, Swingle DM. (1986). « Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions ». *Anal Biochem* 156:220-2.

Stewart, (1993) « Intermediate filaments structure and assembly » *Current Opinion in cell biology* 5 :3-11

Stricker, J., Y. Aratyn-Schaus, P. W. Oakes and M. L. Gardel (2011).«Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions.» *Biophysical journal* 100: 2883-2893.

Tan, J. L., J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju and C. S. Chen (2003).«Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1484-1489.

Théry, M. (2010).«Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions.» *Journal of cell science* 123: 4201-4213.

Trappmann, B., J. E. Gautrot, J. T. Connelly, D. G. T. Strange, Y. Li, M. L. Oyen, M. a. Cohen Stuart, H. Boehm, B. Li, V. Vogel, J. P. Spatz, F. M. Watt and W. T. S. Huck (2012).«Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate.» *Nature materials* 11: 642-649.

Trichet, L., J. Le Digabel, R. J. Hawkins, S. R. K. Vedula, M. Gupta, C. Ribault, P. Hersen, R. Voituriez and B. Ladoux (2012).«Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6933-6938.

Venier, P., Maggs, A. C., Carlier, M.-F. and Pantaloni, D. (1994). Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations. *J.Biol. Chem.* 269, 13353-13360.

Versaevel, M., T. Grevesse and S. Gabriele (2012).«Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells.» *Nature communications* 3: 671.

Vicente-Manzanares, Miguel; Webb, Donna J.; Horwitz, A. Rick (2005). « Cell migration at a glance » *J. Cell Sci.*vol. 118 (21) p. 4917-4919

Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. (1997). « Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of

vascular-like structures in embryoid bodies ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(12):6273-8.

Vogel V, Sheetz M. (2006) « Local force and geometry sensing regulate cell functions. » Nature Reviews Molecular Cell Biology.;7(4):265-75.

von Wichert, G., G. Jiang, A. Kostic, K. De Vos, J. Sap and M. P. Sheetz (2003).«RPTP- α acts as a transducer of mechanical force on α v β 3-integrin-cytoskeleton linkages.» The Journal of cell biology 161: 143-153.

Wang, N., I. M. Tolić-Nørrelykke, J. Chen, S. M. Mijailovich, J. P. Butler, J. J. Fredberg and D. Stamenović (2002).«Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells.» American journal of physiology. Cell physiology 282: C606-616.

White, D. P., P. T. Caswell and J. C. Norman (2007).« α v β 3 and α 5 β 1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration.» 177: 515-525.

Worth, D. C., K. Hodivala-Dilke, S. D. Robinson, S. J. King, P. E. Morton, F. B. Gertler, M. J. Humphries and M. Parsons (2010).«Alpha v beta3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration.» The Journal of cell biology 189: 369-383.

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R., Geiger B. (2007)«Functional atlas of the integrin adhesome.» Nature cell biology 9(8):858-67.

Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B. Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, a. Bershadsky, Z. Kam and B. Geiger (2000).«Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts.» Nature cell biology 2: 191-196.

Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S. J., Critchley, D. R. and Sheetz, M. P. (2008). « Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction ». Nature cell biology 10, 1062–1068.

Zheng, Yujuan; Vertuani, Simona; Nyström, Staffan; Audebert, Stéphane; Meijer, Inèz (2009). « Angiomotin-like protein 1 controls endothelial polarity and junction stability during sprouting angiogenesis » Circulation research vol. 105 (3) p. 260-70 .

Approche mécanique de l'adhésion cellulaire, ouverture au diagnostic.

La capacité des cellules à sentir les propriétés physiques de leur environnement est un facteur déterminant de l'homéostasie tissulaire. Ainsi, la rigidité de la matrice extracellulaire (forces exogènes) et les tensions du cytosquelette (forces endogènes) coopèrent de manière fonctionnelle modulant les transformations phénotypiques. Les cellules perçoivent et transmettent des forces en développant des structures d'adhérences appelées adhésions focales. Ces adhésions sont composées de protéines transmembranaires, les intégrines, qui font le lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. La partie centrale de mon projet de thèse aborde la question du couplage des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la mécanotransduction. Les données actuelles plaident fortement en faveur d'une relation bidirectionnelle entre l'adhésion intégrine-dépendante et les forces mécaniques générées dans ce processus. Les approches génétiques classiques ont souligné le rôle majeur des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans mécanosensibilité cellulaire, sans préciser leur contribution relative. Par exemple, la manière dont la modulation de l'expression de l'intégrine $\beta 3$ affecte la génération des forces de traction cellulaires et la distribution des adhésions intégrines-dépendantes reste à être explorées. Dans ce travail de thèse nous avons montré que les intégrines $\beta 1$ ont un rôle essentiel dans la génération de forces cellulaires, que les intégrines $\beta 1$ sont régulées négativement par les intégrines $\beta 3$ en affectant la distribution spatiale des intégrines $\beta 1$ à travers leur capacité à lier à la fois la taline et la kindline. Et enfin, nous avons montré que les intégrines $\beta 3$ régulent temporellement l'activité contractile de la cellule. J'ai également participé à deux autres études dans le cadre de collaborations avec le Pr. Holmgren et le Dr. Debili, au cours desquelles j'ai utilisé la microscopie à traction de forces comme un outil diagnostique afin d'observer l'effet des forces contractiles dans la formation de la lumen aortique et de la formation des plaquettes sanguines. J'ai ainsi pu confirmer que la protéine amotL2, reliant les fibres contractiles aux VE-cadhérines, est impliquée dans la force intercellulaire nécessaire à la formation de la lumière aortique. Lors d'une deuxième collaboration, j'ai pu montrer que la contractilité des mégacaryocytes, via leur système actomyosine, est nécessaire pour la formation des proplaquettes.

Mots clefs: intégrines, adhérence, forces de traction, contractilité cellulaire, mécanotransduction.

A mechanical approaches to cellular adhesions and its application to medical diagnostics

Cell ability to sense mechanical properties of their microenvironment is crucial for tissue homeostasis which means their capacity to maintain mechanical integrity as they are submitted to external forces. Integrins have been highlighted as mechanotransducers able to form micro-scale structures called focal adhesion sites which mechanically link cells to the extracellular matrix by recruiting various adaptors. Both $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins have been identified as the principal actors of tensional homeostasis. However as the resulting mechanotransduction processes are intrinsically dynamic, the respective and cooperative roles $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins need to be addressed over time and space. In the present work, coupling time-resolved traction force microscopy and genetics approaches, we investigated the respective role of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in active force generation at the single cell level. Our findings show that $\beta 1$ integrins has an essential role in generation of cellular traction forces, $\beta 1$ integrin-generated force is negatively regulated by $\beta 3$ integrins which impacts the redistribution of $\beta 1$ integrin containing adhesion through its ability to bind to talin and kindlin, $\beta 3$ integrin supports min-scale temporal regulation of cellular contractile activity generated by $\beta 1$ integrin. Finally, cell mechanical equilibrium relies on the ability of cells to maintain a fixed contractile moment. I also participated in two others studies in the framework of collaborations in which I used the traction force microscopy as a diagnostic tool to observe the effect of contractile forces in the formation of the aortic lumen and the formation of proplatelets. I was able to confirm that the protein amotL2 connecting the contractile fibers to VE-cadherin, is involved in intercellular forces necessary for the formation of the aortic lumen. And in a second collaboration, where I found by using traction force microscopy that the contractility of megakaryocytes via its actomyosin system, is necessary for the formation proplatelets.

Keywords: integrins, adhesions, cell traction forces, mechanotransduction.